

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

Karin Scheschowitsch

**TRANSLOCAÇÃO NUCLEAR DE NF-KB E DE RECEPTORES
DE GLICOCORTICOIDES EM CÉLULAS MUSCULARES
LISAS: ENVOLVIMENTO DO ÓXIDO NÍTRICO E DO
PEROXINITRITO**

Florianópolis
2011

Karin Scheschowitsch

**TRANSLOCAÇÃO NUCLEAR DE NF-KB E DE RECEPTORES
DE GLICOCORTICOIDES EM CÉLULAS MUSCULARES
LISAS: ENVOLVIMENTO DO ÓXIDO NÍTRICO E DO
PEROXINITRITO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Jamil Assreuy

Florianópolis
2011

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

S326t Scheschowitsch, Karin

Translocação nuclear de NF- κ B e de receptores de glicocorticoides em células musculares lisas [dissertação] : envolvimento do óxido nítrico e do peroxinitrito / Karin Scheschowitsch ; orientador, Jamil Assreuy. - Florianópolis, SC, 2011.

109 p.: il., grafs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

Inclui referências

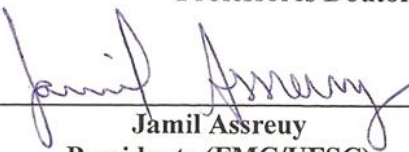
1. Farmacologia. 2. Lipopolissacarídeos. 3. Interferon. 4. Translocação. 5. Receptores de substâncias endógenas. 6. Células Musculares Lisas. I. Assreuy, Jamil. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

CDU 615

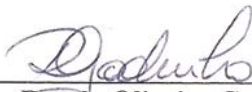
“Translocação nuclear de NF- κ B e de receptores de glicocorticoides em células musculares lisas: envolvimento do óxido nítrico e do peroxinitrito”

KARIN SCHESCHOWITSCH

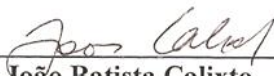
Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros da Banca Examinadora, composta pelos Professores Doutores:



Jamil Assreuy
Presidente (FMC/UFSC)



Rosely Oliveira Godinho
(UNIFESP)



João Batista Calixto
(FMC/UFSC)

Prof. Dr. Antônio de Pádua Carobrez
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Farmacologia/UFSC

Florianópolis, 24 de fevereiro de 2011.

"A sabedoria da vida não consiste em fazer aquilo que se gosta, mas em gostar do que se faz."

(Leonardo da Vinci)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela saúde, pelas oportunidades e pelas pessoas que fazem parte da minha vida.

Ao Prof. Jamil, por aceitar me orientar, pela confiança em mim depositada, por não medir esforços para que a realização deste trabalho fosse possível, pela compreensão nos momentos difíceis e pela amizade e boas conversas durante estes dois anos.

Aos meus pais, Erich e Anita, por todos os ensinamentos, pelo apoio incondicional e pelo exemplo de perseverança.

Às minhas irmãs e ao meu irmão pela amizade, pelos conselhos e pelas conversas divertidas apesar da distância física e da dificuldade em reunir a família fisicamente.

Ao Georges pelo amor, companheirismo, amizade, paciência, compreensão, ensinamentos e ajuda técnica em todos estes anos que estamos juntos.

À Profa. Cristina Barja-Fidalgo e aos pós-graduandos de seu laboratório na UERJ, Cristiane, João, Simone, Rafael e demais colegas pela ajuda e prestatividade durante o período que fiquei na UERJ fazendo experimentos.

À Sílvia, por quem tenho muita admiração, por toda ajuda prestada, pelos inúmeros ensinamentos repassados, pela paciência, incentivo e compreensão nos momentos difíceis, pela amizade, pelas boas conversas e muitas risadas nestes seis anos de convivência.

Ao Jarbas, que me ensinou a trabalhar com cultura de células durante a iniciação científica e por ter me ajudado a padronizar a técnica de imunofluorescência.

À Adriane pelo apoio técnico fundamental para a realização deste trabalho, pelo carinho e pela amizade durante este período.

A todos os colegas de laboratório que se tornaram amigos e são minha segunda família, pelo carinho, prestatividade e por tornaram o dia-a-dia mais divertido.

À Regina e ao Daniel pela amizade e por saber que são pessoas que poderei contar sempre.

À Sofia e ao Rafael pela hospedagem no Rio de Janeiro.

Aos professores Calixto, José Eduardo, Edmundo, Pádua, Rosa por emprestarem reagentes e permitirem o uso de seus equipamentos.

Ao Dib por ter emprestado reagentes que foram fundamentais para a realização de vários experimentos e pelos ensinamentos repassados.

Ao LCME e às técnicas Renata e Eliana pela ajuda e realização da microscopia confocal.

Ao Dênis e à Bibiana, pelo apoio técnico no TECAN.

Aos demais colegas e professores do Departamento de Farmacologia pela ajuda que recebi sempre que solicitei, pelas amizades e pelo bom convívio.

A todos os funcionários do Departamento de Farmacologia pela ajuda prestada.

Ao CNPq, a CAPES e ao PROCAD pelo apoio financeiro, fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

O lipopolissacarídeo (LPS) é um componente da parede de bactérias Gram-negativas capaz de induzir respostas inflamatórias sistêmicas pela capacidade de ativar o fator de transcrição nuclear κ B (NF- κ B). Além do LPS, a presença de citocinas como IFN- γ , também promovem a ativação do NF- κ B. Uma vez que este fator é ativado, inúmeros genes pró-inflamatórios são transcritos, elevando a expressão de citocinas como TNF- α , IL-1, IL-6, IFN- γ e a enzima NOS-2. Um dos mecanismos endógenos anti-inflamatórios mais importantes é a ativação de receptores de glicocorticoides (GR). Utilizando um modelo *in vitro* baseado em aspectos relevantes da sepse, uma doença de cunho inflamatório, mostrou-se que células musculares lisas (CML) de aorta de rato da linhagem A7r5 são ativadas pelo estímulo LPS/IFN produzindo NO, dosado na forma do seu metabólito, nitrito. De forma inédita, observou-se que a ativação das CML depende de um pulso inicial de NO oriundo de NOS constitutivas, uma vez que a inibição do mesmo diminui substancialmente a ativação celular. Além do pulso de NO, ocorre também uma rápida produção de EROs após estimulação das células com LPS. A caracterização e presença de GR funcionais nestas células permitiram o acompanhamento da sua dinâmica após estimulação com LPS/IFN. Surpreendentemente, a estimulação com LPS/IFN induz um aumento na translocação nuclear destes receptores de forma concomitante com a translocação nuclear do NF- κ B, cuja intensidade de translocação é parcialmente regulada pelo NO. Outro fator que parece intermediar a translocação nuclear de GR e NF- κ B e exercer um papel fundamental no curso da ativação celular é o peroxinitrito, que pode estar sendo formado imediatamente após a estimulação das células pela reação do pulso de NO com o ânion superóxido. Os resultados mostram que o NO e seus derivados desempenham um papel fundamental no início da ativação celular e na translocação nuclear de GR, contribuindo para o entendimento do início do processo de ativação celular.

Palavras-chave: Lipopolissacarídeo, Interferon- γ , translocação nuclear, NF- κ B, receptores de glicocorticoides, células musculares lisas.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo clássico de ativação do NF- κ B pelo LPS	37
Figura 2. Interações entre o óxido nítrico, ânion superóxido, peroxinitrito e dióxido de nitrogênio.....	46
Figura 3. Esquema de detecção de NO pelo composto DAF-FM DA e DAF-FM.....	60
Figura 4. Curso temporal da produção de NO por CML A7r5 estimuladas com LPS/IFN por 24, 48 e 72 horas	66
Figura 5. Avaliação da viabilidade celular pela taxa de proliferação mitocondrial durante o processo de ativação celular.....	67
Figura 6. Produção de EROs em CML A7r5 2 horas após estimulação com LPS e heme e interferência de doadores de NO..	68
Figura 7. Produção de EROs em CML A7r5 4 horas após estimulação com LPS e heme e interferência de doadores de NO	69
Figura 8. Inibição da ativação celular por concentrações crescentes de dexametasona.....	70
Figura 9. Reversão do efeito inibitório da ativação celular da dexametasona por concentrações crescentes do antagonista de GR, RU-486.....	71
Figura 10. Avaliação da viabilidade celular pela taxa de proliferação mitocondrial em CML A7r5 incubadas com dexametasona e RU-486 e estimuladas com LPS/IFN por 48 horas.....	71
Figura 11. Curso temporal e efeito de inibidores das NOS na produção inicial de NO em CML medida por fluorescência.....	73
Figura 12. Efeito da inibição da produção inicial de NO no acúmulo de nitrito no sobrenadante da cultura celular.	73
Figura 13. Presença de NOS-1 e NOS-3 no extrato total de células musculares lisas A7r5 avaliada por imunoeletoforese.....	74
Figura 14. Quantificação e ilustração da translocação nuclear de NF- κ B 0,5, 2 e 4 horas após estimulação com LPS/IFN.....	76
Figura 15. Quantificação e ilustração do curso temporal de translocação nuclear de GR após estimulação com LPS/IFN	77
Figura 16. Ilustração da sobreposição do curso temporal de translocação nuclear de NF- κ B e GR após estimulação com LPS/IFN.	78
Figura 17. Efeito da inibição das NOS constitutivas e do sequestro de NO sobre a translocação nuclear do NF- κ B (Painel A) e de GR (Painel B) nas CML A7r5 avaliado por imunofluorescência	79

Figura 18. Curso temporal da translocação nuclear de NF- κ B avaliado por imunoeletroforese em CML A7r5 após estimulação com LPS/IFN	80
Figura 19. Curso temporal da translocação nuclear de GR avaliado por imunoeletroforese em CML A7r5 após estimulação com LPS/IFN.....	81
Figura 20. Efeito da inibição das NOS constitutivas e do sequestro de NO sobre a translocação nuclear de NF- κ B e GR em CML avaliado por imunoeletroforese.....	82
Figura 21. Curva temporal da produção de nitrito por CML estimuladas com LPS/IFN na presença e na ausência de um inibidor não seletivo para NOS e de um <i>scavenger</i> de NO.....	83
Figura 22. Efeitos do heme, GTN e SIN-1 sobre a translocação nuclear de NF- κ B e de GR em CML A7r5 avaliado por imunoeletroforese.	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Grupos experimentais utilizados nos experimentos de imunofluorescência e detecção de NO pela sonda DAF-FM DA.	58
Tabela 2. Grupos experimentais utilizados no experimento de mensuração da produção de EROs por sonda fluorescente.	61
Tabela 3. Grupos experimentais utilizados nos experimentos de imunoelektroforese.	62

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Célula muscular lisa em repouso	94
Esquema 2. Mecanismos da ativação celular das CML	95
Esquema 3. Mecanismos da ativação celular das CML e do envolvimento do NO e peroxinitrito neste processo.	96

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

•NO₂	Dióxido de nitrogênio
A₂₀	Proteína inibitória da poliubiquitinação
AP-1	Proteína ativadora 1
CBP	Proteína de ligação ao CREB
CML	Células musculares lisas
CREB	Elemento responsivo de ligação do cAMP
EROs	Espécies Reativas de oxigênio
GC	Glicocorticoides
GR	Receptores de glicocorticoides
GREs	Elementos responsivos aos glicocorticoides
HPA	Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal
HSP	Proteínas de choque térmico
MyD88	Proteína de diferenciação mielóide 88
NEMO	Subunidade reguladora não enzimática de IKK
NF-κB	Fator de transcrição nuclear kappa B
nGREs	Elementos negativos responsivos aos glicocorticoides
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintases
NOX	NADPH oxidases
O₂•-	Ânion superóxido

OH•	Radical hidroxil
ONOO-	Peroxinitrito
PIN	Proteína inibidora das NOS
RHR	Domínio de homologia Rel
RSNO	S-nitrosotiois
SH	Sulfidrila livre
THB4	(6R)-5,6,7,8-tetrahidrobiopterina
TLR	Receptores do tipo Toll-like

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	33
1.1	O processo inflamatório.....	33
1.1.1	Aspectos moleculares	33
1.1.2	Aspectos moleculares	34
1.1.3	Vias de sinalização iniciadas pelo LPS e IFN- γ	38
1.2	Espécies reativas de oxigênio	39
1.3	Espécies reativas de nitrogênio.....	41
1.4	Glicocorticoides.....	47
1.4.1	Mecanismos de ação dos glicocorticoides	48
1.5	Células musculares lisas (CML)	51
1.6	Justificativa	52
2	OBJETIVOS	54
2.1	Objetivo Geral.....	54
2.2	Objetivos específicos.....	54
3	MATERIAIS E MÉTODOS	55
3.1	Materiais	55
3.2	Cultura celular.....	56
3.3	Avaliação da produção de NO	56
3.4	Avaliação da viabilidade celular.....	57
3.5	Imunofluorescência.....	58
3.6	Mensuração da produção de NO por sonda fluorescente: DAF-FM DA	59
3.7	Mensuração da produção de EROs por sonda fluorescente	60
3.8	Imunoeletroforese (Western blotting)–Preparação das amostras	61
3.9	Western blotting – Separação de proteínas e imunodeteção	63
3.10	Análise estatística.....	64
4	RESULTADOS	66
4.1	Produção de NO por células musculares lisas A7r5 estimuladas com LPS/IFN	66
4.2	Formação de EROs durante a ativação celular e influência de doadores de NO.....	67
4.3	Caracterização da presença e funcionalidade dos receptores de GC.....	70
4.4	Dependência da produção inicial de NO para a ativação celular	72
4.5	Imunoeletroforese para NOS-1 e NOS-3	74
4.6	Imunocitoquímica: Translocação nuclear do NF- κ B e de GR, seu curso temporal e envolvimento de NO.....	74

4.7	Imunoeletroforese (<i>Western blotting</i>): Translocação nuclear de NF- κ B e de GR, seu curso temporal e envolvimento de NO.....	80
4.8	Translocação nuclear de NF- κ B e de GR por imunoeletroforese: envolvimento de NO, EROs e peroxinitrito	83
5	DISCUSSÃO	85
6	CONCLUSÕES	98
	REFERÊNCIAS	99

1 INTRODUÇÃO

1.1 O processo inflamatório

1.1.1 Aspectos moleculares

A inflamação pode ser definida como uma resposta de um organismo frente a algum dano tecidual, geralmente é autolimitada, e visa garantir a remoção do estímulo deletério, bem como o reparo dos danos teciduais por ele causados. Os agentes etiológicos do processo inflamatório são vários, destacando-se entre eles os microrganismos, os agentes químicos (ácidos, bases, toxinas, metais pesados), os agentes físicos (calor, frio, radiações, eletricidade) e outros distúrbios celulares relacionados à autoimunidade (GUYTON e HALL, 2002; RANG *et al.*, 2008; CRANSHAW e GRIFFITHS, 2003; MANKAN *et al.*, 2009; TAKEUCHI e AKIRA, 2010).

O processo inflamatório agudo é caracterizado por vasodilatação local que leva ao aumento do fluxo sanguíneo na área inflamada, provocando dois dos sintomas clássicos da inflamação: calor e rubor. Outro acontecimento clássico é o aumento da permeabilidade microvascular, que consiste na saída de um fluido rico em proteínas (exsudato) dos vasos para os tecidos e que se acumula no local da lesão provocando edema (CIRINO, FIORUCCI e SESSA, 2003; PATTERSON e LUM, 2001; LEY, 2002; RANG *et al.*, 2008; TAKEUCHI e AKIRA, 2010). A compressão das terminações nervosas provoca dor, que é potencializada pela ação de algumas citocinas (DAVIES e HAGEN, 1997; RANG *et al.*, 2008).

O aumento da permeabilidade vascular e da viscosidade do sangue diminui o fluxo sanguíneo facilitando a marginalização dos leucócitos que são atraídos para o local inflamado por quimiotaxia (SIEGELMAN, STANESCU e ESTESS, 2000; FRANGOIANNIS, SMITH e ENTMAN, 2002). Concomitantemente, ocorre a produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como fator de necrose tumoral (TNF- α) e interleucina-1 (IL-1) que ativam vias de sinalização em células endoteliais e regulam a expressão de moléculas de adesão para que leucócitos e células fagocíticas possam infiltrar-se para o sítio da lesão (UMEZAWA, ARIGA e MATSUMOTO, 2000; FRANGOIANNIS, SMITH e ENTMAN, 2002; SMITH, 1993). A segunda etapa do processo inflamatório consiste na remoção do agente agressor e de tecidos mortos pelas células recém-infiltradas no local da lesão e indução da reparação do epitélio (reepitelização), do parênquima

(regeneração) e do estroma (cicatrização) (HERSH, WEISS e ZYCHLINSKY, 1998; CONE, 2001).

1.1.2 Aspectos moleculares

O fator de transcrição nuclear κB (NF- κB) é crucial para o desenvolvimento da resposta inflamatória em todos os tipos celulares de mamíferos (ROTHWARF e KARIN, 1999). Foi descoberto em 1986 por SEN e BALTIMORE e sabe-se atualmente que é responsável pela transcrição de mais de 60 genes pró-inflamatórios envolvidos, por exemplo, no controle da expressão de moléculas de adesão (ICAM e VCAM), de proteínas virais, no mecanismo de indução de apoptose e, principalmente, na síntese de inúmeras citocinas (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α , IFN- γ) (SEN e BALTIMORE, 1986; BAEUERLE, 1998; ROTHWARF e KARIN, 1999; UMEZAWA, ARIGA e MATSUMOTO, 2000; JEON, JEONG e JUE, 2000; HAYDEN e GHOSH, 2011).

O NF- κB pode existir na forma de homo ou heterodímeros formados por proteínas pertencentes à família κB , sendo 5 delas identificadas no citoplasma de células de mamíferos. O dímero mais abundante e primeiramente identificado é o heterodímero formado pelas proteínas p65 (Rel A) e p50. As outras proteínas são: p105 (precursora da p65), p52, p100 (precursora da p50), c-Rel e Rel B, todas compartilhando uma região RHR (do inglês, *Rel homology region*) composta por cerca de 300 aminoácidos, responsável pela dimerização, ligação com o DNA e interação com as proteínas inibitórias I κB (BAEUERLE, 1998; ROTHWARF e KARIN, 1999; UMEZAWA, ARIGA e MATSUMOTO, 2000).

Em condições normais, o NF- κB (p65/p50) permanece predominantemente no citoplasma ligado à sua proteína inibitória, o I κB , a qual o mantém em estado inativo. Pelo menos 6 proteínas da família I κB estão envolvidas no controle da atividade do NF- κB . Dentre estas, o I $\kappa B\alpha$, I $\kappa B\beta$ e I $\kappa B\epsilon$ sequestram o NF- κB no citoplasma, sendo o I $\kappa B\alpha$ a proteína inibitória mais abundante e mais estudada. As proteínas I $\kappa B\gamma$, I $\kappa B\delta$ e Bcl-3 atuam como co-ativadores do NF- κB no núcleo. Por exemplo, o Bcl-3 se liga à homodímeros de p50 ou p52 para estimular a transcrição (BAEUERLE, 1998; ROTHWARF e KARIN, 1999; LIU e CHEN, 2011). Todas as proteínas I κB s possuem uma repetição de 6 ou 7 motivos de anquirinas que se posicionam próximos à sequência de localização nuclear (NLS) presente no domínio RHR, e dessa forma,

impedem a sua ligação com as proteínas que transportam o NF- κ B para o núcleo (ROTHWARF e KARIN, 1999; KARIN e DELHASE, 2000).

A via clássica de ativação e translocação nuclear do NF- κ B, envolvida na resposta inflamatória e nos mecanismos de sobrevivência, requer a remoção da proteína I κ B α do complexo NF- κ B/ I κ B α . Após um estímulo (como, por exemplo, TNF- α , IL-1 ou lipopolissacarídeo), um complexo de quinases de I κ B, chamadas de IKK são fosforiladas e tornam-se ativas. Este complexo é formado por 2 subunidades (IKK α e IKK β) que fosforilam dois resíduos de serina N-terminais do I κ B e uma subunidade reguladora não enzimática (IKK γ , também chamada NEMO) (JEON, JEONG e JUE, 2000; UMEZAWA, ARIGA e MATSUMOTO, 2000; SHIH *et al.*, 2011). A porção C-terminal da subunidade IKK γ serve como ponto de conexão para a ativação das subunidades IKK α e IKK β e sinalização de outras proteínas, sendo a IKK β essencial para a ativação do NF- κ B (KARIN e DELHASE, 2000). Os resíduos N-terminais de I κ B fosforilados são imediatamente reconhecidos pelo complexo ubiquitina ligase E3. A poliubiquitinação do I κ B é rapidamente reconhecida e o conjunto é degradado pelo proteossoma 26S. No momento em que o I κ B é degradado, o NLS do NF- κ B fica exposto, é reconhecido pelas carioferinas (proteínas de transporte nucleocitoplasmático) e translocado para o núcleo. Uma vez no núcleo, o NF- κ B se liga em sua região promotora do DNA e inicia a transcrição de inúmeros genes, particularmente genes relacionados à atividade pró-inflamatória, como TNF- α , IL-1, IL-6, fator de ativação plaquetária (PAF) e a enzima óxido nítrico sintase 2 (NOS-2) (BAEUERLE, 1998; ROTHWARF e KARIN, 1999; KELLEHER *et al.*, 2007; KARIN e DELHASE, 2000; HARHAJ e DIXIT, 2011; LIU e CHEN, 2011).

Do ponto de vista de controle da ativação, durante a transcrição gênica do NF- κ B ocorre também a transcrição de uma proteína (A20) que forma um complexo com a ligase E3 que remove os resíduos de ubiquitina da proteína TRAF6 e interrompe a fosforilação do complexo de IKK no citoplasma (SRISKANTHARAJAH e LEY, 2010). Um segundo mecanismo que ocorre simultaneamente para interromper a atividade do NF- κ B é a síntese de novas moléculas de I κ B α que entram no núcleo e se ligam ao NF- κ B fazendo com que este seja deslocado do seu sítio no DNA e o complexo NF- κ B/I κ B α retorne inativo para o citoplasma (BAEUERLE, 1998; ROTHWARF e KARIN, 1999; NATOLI e CHIOCCA, 2008).

Além dos processos de ativação descritos acima, existe uma via não-clássica, que pode ser ativada por radiações ionizantes, agentes

oxidantes, algumas citocinas e por fatores de crescimento. A ativação desta via ocorre lentamente e de maneira irreversível, sendo mediada por um complexo de quinases independentes da subunidade NEMO que envolvem a atividade da IKK α e da quinase indutora de NF- κ B (NIK, abreviatura do inglês, *NF- κ B-inducing kinase*). Para formar o complexo Rel B/p52, que é insensível ao I κ B e por isso se localiza no núcleo, são sintetizadas as subunidades p100 e Rel B que permanecem no citoplasma, sendo esta uma das razões para a lentidão da ativação desta via (para revisão ver LUO, KAMATA e KARIN, 2005 e SHIH *et al.*, 2011).

A Figura 1 representa de forma simplificada o mecanismo de ativação clássico do NF- κ B pelo LPS.

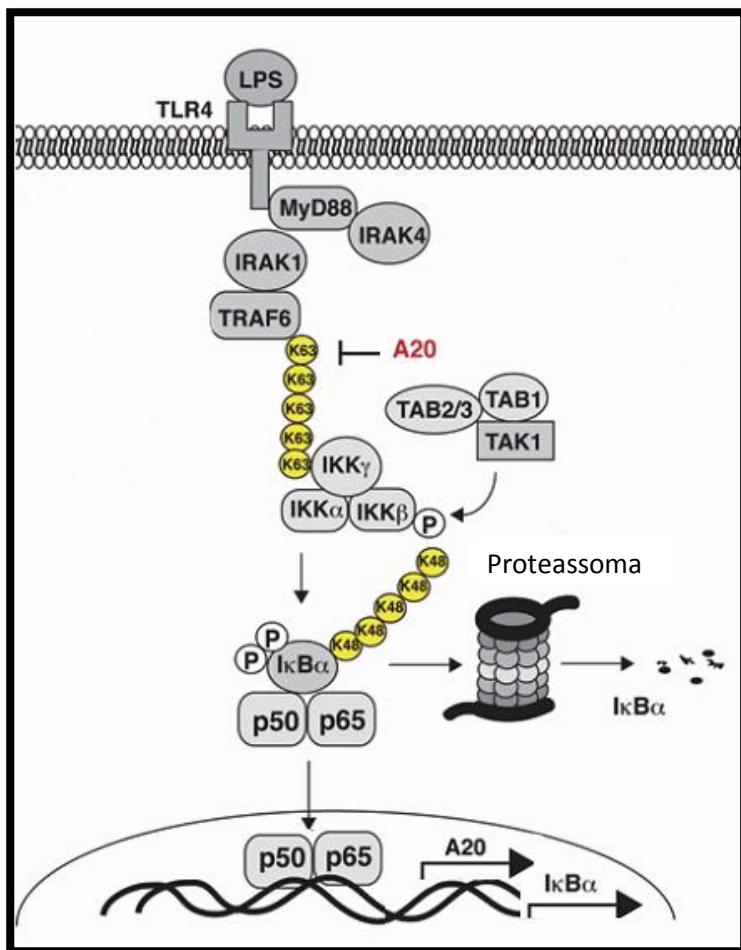


Figura 1. Mecanismo clássico de ativação do NF-κB pelo LPS. O LPS é reconhecido pelos receptores *Toll like 4* que ativa uma série de proteínas acessórias (MyD88, IRAK4, IRAK1 e TRAF6). A ativação destas proteínas culmina na ativação do complexo de quinases de IκB (IKK) que iniciam a fosforilação da proteína inibitória IκBα e, conseqüentemente, a poliubiquitinação da mesma e degradação pelo proteassoma 26S. Ao ocorrer à dissociação da IκBα do NF-κB, esse é translocado para o núcleo, onde inicia a transcrição de inúmeros genes pró-inflamatórios e também de algum genes de proteínas anti-inflamatórias, como a própria IκBα e também da proteína A20, a qual inibe a ativação das IKKs. Adaptado de HARHAJ e DIXIT (2011).

1.1.3 Vias de sinalização iniciadas pelo LPS e IFN- γ

O lipopolissacarídeo (LPS) é um componente da parede de bactérias Gram-negativas que exibe grande capacidade de estimulação do NF- κ B e indução de respostas inflamatórias. O reconhecimento do LPS e de outros inúmeros padrões moleculares associados a micro-organismos (PAMPS) é feito através de receptores da família *Toll-like* (TLR), que é constituída por pelo menos 10 receptores. Estes são caracterizados por uma porção N-terminal rica em repetições de leucina, uma região transmembrânica e um domínio citoplasmático de homologia ao receptor (TIR, abreviatura do inglês, *Toll/IL-1 receptor homology domain*).

O receptor do tipo *Toll-like 4* (TLR4) reconhece o LPS, o fator de diferenciação mieloide 2 (MD2) e também alguns vírus encapsulados. Ao reconhecer algum de seus ligantes, é iniciada uma cascata de sinalização para ativar o NF- κ B. A ativação do TLR4 depende da ligação do seu domínio intracelular TIR à quinase associada ao receptor IL-1 (IRAK, abreviatura do inglês, *IL-1 receptor-associated kinase*). Esta ligação necessita da proteína adaptadora contida no domínio TIR (TIRAP, abreviatura do inglês, *TIR domain containing adapter protein*) para fazer a ponte com outra proteína adaptadora, a proteína de diferenciação mieloide (MyD88, abreviatura do inglês, *myeloid differentiation protein 88*). MyD88 é quem faz a ligação com a IRAK-4, uma serina/treonina quinase que ativa as proteínas IRAK-1 e IRAK-2. Após formar estes complexo as IRAKs dissociam-se da MyD88 e interagem com o fator associado ao receptor de TNF- α (TRAF6, abreviatura do inglês, *TNFR-associated factor 6*), que atua como uma ubiquitina ligase E3. TRAF6 E3 ligase se associa com a enzima E2 Ubc13 ou Ubc5. Esta associação promove a autoubiquitinilação do TRAF6 que catalisa a formação de um domínio K63 conjugado ao TRAF6 (abreviatura do inglês, *lysine 63-linked polyubiquitin chain*) e outro domínio K63 livre. O domínio K63 livre ativa um complexo formado pela quinase ativada pelo TGF- β (TAK1, abreviatura do inglês, *TGF- β -activated kinase 1*), pelas proteínas de ligação do TAK1 (TAB1, TAB2 e TAB3, abreviatura do inglês, *TAK1 binding protein*) que fosforilam a IKK β e a MAP quinase quinase 6. O complexo de IKKs fosforiladas fosforilam o I κ B α , que sofre um processo de ubiquitinilação e é degradado rapidamente pelo proteassoma 26S, possibilitando a translocação do NF- κ B para o núcleo onde inicia a transcrição gênica. A

fosforilação inicial da cascata de MAP quinases é responsável pela ativação do fator de transcrição AP-1 (TAKEUCHI e AKIRA, 2010).

Além de ser reconhecido pelo TLR-4, o LPS também é reconhecido pelo receptor sequestrador de macrófagos (MSR, abreviatura do inglês, *macrophage scavenger receptor*), por canais iônicos e pelos receptores intracelulares de oligomerização do domínio de ligação ao nucleotídeo (NOD, abreviatura do inglês, *nucleotide-binding oligomerization domain*) (COHEN, 2002).

Os interferons afetam diversas funções celulares, incluindo respostas antivirais, antimicrobianas, de apoptose e de controle do ciclo celular. Esta família de citocinas é dividida em três classes: tipo I (α , β , ω e τ), tipo II (γ) e tipo III (λ). O interferon- γ (IFN), único da classe II, é uma citocina produzida principalmente por células do sistema imune ativadas para combater infecções virais e bacterianas (GOUGT *et al.*, 2008). Sua expressão pode ativar o NF- κ B via indução da fosforilação das IKKs, bem como também pode ser induzida em quase todos os tipos celulares pela transcrição de genes mediada pelo NF- κ B (HAYDEN e GHOSH, 2011). Esta citocina exerce seus efeitos através da ligação com seu receptor, o IFN γ R1 ou IFN γ R2. O mecanismo clássico ocorre através das quinases JAK1 e JAK2 (abreviatura do inglês, *Janus kinase*) pré-associadas aos respectivos receptores que têm a função de aproximar um ao outro para que possa ocorrer a transfosforilação entre eles e também dos domínios citoplasmáticos dos mesmos. A fosforilação da tirosina do receptor IFN γ R1 cria um ponto de ligação para o domínio SH₂ do fator de transcrição STAT1, a qual é fosforilada e forma um homodímero que se dissocia do receptor e transloca para o núcleo onde inicia a transcrição de genes que contém a sequência ativada por *gamma* (GAS, abreviatura do inglês, *gamma activated sequence*) em sua região promotora (VAN BOXEL-DEZAIRE e STARK, 2007; GOUGT *et al.*, 2008).

1.2 Espécies reativas de oxigênio

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são geradas a partir de várias reações intracelulares, como por exemplo o transporte de elétrons na mitocôndria, pela atividade de enzimas como as NADPH oxidases (NOX), lipoxigenases (LOX) e ciclooxigenases (COX) que produzem superóxido durante sua atividade. Como exemplos de EROs pode-se citar o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), o radical hidroxil (OH \cdot), o ânion superóxido (O₂ \cdot^-), o ácido hipocloroso (HOCl), ozônio (O₃) e muitos de

seus subprodutos. As NOX reduzem o oxigênio molecular produzindo superóxido em resposta a fatores de crescimento, citocinas e sinalizações de cálcio. Esta família de enzimas desempenha papel importante nos mecanismos de defesa, apoptose, angiogênese, funções endócrinas e modificações oxidativas de matrizes e/ou proteínas extracelulares (GLOIRE, LEGRAND-POLES e PIETTE, 2006; LIAUDET, VASSALLI e PACHER, 2009; MORGAN e LIU, 2011). O ânion superóxido pode ser convertido em peróxido de hidrogênio pela superóxido dismutase, na presença de mieloperoxidase e uma fonte de íons cloreto forma ácido hipocloroso para combater micro-organismos invasores, uma vez que este é um microbicida potente (LAMBETH, 2004).

Em condições normais, as pequenas quantidades de EROs geradas pela cadeia respiratória e outros produtores de EROs atuam como segundos mensageiros, participando da homeostase dos tecidos. Entretanto, quando a concentração de EROs atinge níveis elevados e as enzimas antioxidantes como peroxidases, superóxido dismutase e catalase não são capazes de neutralizar todas elas, ocorre um processo chamado de estresse oxidativo. Durante condições de estresse oxidativo, as EROs que são citotóxicas, reagem com inúmeras proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos causando danos muitas vezes irreversíveis às células (LAMBETH, 2004; GLOIRE, LEGRAND-POLES e PIETTE, 2006; MORGAN e LIU, 2011).

Segundo a revisão feita por GLOIRE, LEGRAND-POLES e PIETTE (2006) baixas concentrações de EROs induzem a ativação de um fator de transcrição (Nrf2) que aumenta a produção de enzimas antioxidantes. Concentrações intermediárias iniciam uma resposta inflamatória através da ativação do NF- κ B e de AP-1, e concentrações muito elevadas de EROs interrompem a cadeia respiratória e induzem mecanismos de apoptose e até mesmo necrose. Contudo, a caracterização das sinalizações intracelulares iniciadas pelas EROs ainda é bastante complexa e contraditória em função das sinalizações ocorrerem de várias formas e simultaneamente. Como pode ser visto na revisão recentemente publicada por MORGAN e LIU (2011), elas podem estimular ou inibir uma mesma via dependendo do contexto, da localização intracelular onde as EROs são geradas, da quantidade e do tipo celular estudado.

Estas dificuldades e complexidades são observadas no caso da interação entre as EROs e o NF- κ B, apesar do NF- κ B ter sido o primeiro fator de transcrição redox-sensível demonstrado (SCHRECK, RIEBER e BAUERLE, 1991; MORGAN e LIU, 2011). A produção de EROs

pode induzir ou inibir a atividade do NF- κ B no citoplasma e no núcleo, dependendo do contexto e da célula (para revisão ver GLOIRE, LEGRAND-POLES e PIETTE, 2006; LOUKILI *et al.*, 2010; MORGAN e LIU, 2011). No entanto, até o momento a hipótese mais aceita é a de que EROs ativam o NF- κ B no citoplasma e inibem sua atividade no núcleo (KABE *et al.*, 2005; MORGAN e LIU, 2011).

As primeiras demonstrações de que havia participação de EROs na ativação do NF- κ B pelo LPS ocorreram há poucos anos atrás, quando a incubação com antioxidantes (N-acetilcisteína e DMSO) inibiram a ativação do NF- κ B pelo LPS em macrófagos (ASEHNOUNE *et al.*, 2004; RYAN *et al.*, 2004). Ainda em 2004, foi demonstrado que a produção de EROs induzida pelo LPS e a consequente ativação do NF- κ B eram mediadas pela interação direta do receptor TLR-4 com a enzima NADPH oxidase 4 (NOX4) (PARK *et al.*, 2004) e possivelmente mais alguma NOX em células monocíticas (GLOIRE, LEGRAND-POLES e PIETTE, 2006). Dois anos depois, este mecanismo foi demonstrado também em células endoteliais (PARK *et al.*, 2006).

1.3 Espécies reativas de nitrogênio

As espécies reativas de nitrogênio (ERN) são na verdade formadas por nitrogênio e oxigênio e incluem o óxido nítrico (\cdot NO), o dióxido de nitrogênio (\cdot NO₂), o trióxido de di-nitrogênio (N₂O₃), o peroxinitrito (ONOO⁻) e de seus produtos (PACHER, BECKMAN e LIAUDET, 2007; LIAUDET, VASSALLI e PACHER, 2009).

O óxido nítrico (NO), uma das menores e mais simples moléculas biossintetizadas, é um gás incolor e inodoro que possui um elétron desemparelhado e, por isso, relativamente instável. É um importante modulador endógeno que desempenha inúmeras atividades biológicas, das quais as mais importantes são a ativação da enzima guanilato ciclase e atuação como neurotransmissor (BECKMAN e KOPPENOL, 1996). É sintetizado endogenamente pelas enzimas óxido nítrico sintases (NOS), através da conversão de L-arginina em L-citrulina (PALMER, ASHTON e MONCADA, 1988). Foram identificadas três diferentes isoformas de NOS em células de mamíferos: NOS neuronal (NOS-1 ou nNOS) que foi a primeira destas enzimas a ser clonada e purificada a partir de neurônios, NOS induzida (NOS-2 ou iNOS) encontrada primeiramente em macrófagos e NOS endotelial (NOS-3 ou eNOS) encontrada em células endoteliais (PALMER, ASHTIN e MONCADA,

1988; MONCADA e HIGGS, 2006; PACHER, BECKMAN e LIAUDET, 2007).

Todas as NOS são heme proteínas com estrutura molecular homodimérica na forma ativa, onde cada monômero apresenta um domínio redutor na porção C-terminal onde estão localizados os sítios de ligação para o mononucleotídeo de flavina (FMN), dinucleotídeo de flavina e adenina (FAD) e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), e outro oxidante na porção N-terminal constituído por sítios de ligação para (6R)-5,6,7,8-tetrahidrobiopterina (THB4) e ferroprotoporfirina IX (heme) para catalisar a reação. Entre os dois domínios está localizado o sítio de ligação do cálcio à calmodulina (CaM) (ALDERTON, COOPER e KNOWLES, 2001; LI e POULOS, 2005). Esta semelhança estrutural entre as isoenzimas contribui para a baixa seletividade dos inibidores sintéticos (ALDERTON, COOPER e KNOWLES, 2001).

Considera-se que as enzimas NOS-1 e NOS-3 são constitutivas, ou seja, estão presentes em situações fisiológicas. Estas duas isoformas respondem fisiologicamente à ativação de receptores e estímulos físicos e são ativadas pela calmodulina e concentrações micromolares de cálcio (0,1 a 1 μM) ou por fosforilação. Uma vez ativadas, liberam pequenas quantidades de NO (na faixa de nM) por curtos períodos de tempo (segundos a minutos). Já a enzima NOS-2 tem sua expressão induzida por diversos estímulos, como citocinas e LPS, e é ativada independentemente de cálcio, uma vez que ela requer somente cerca de 100 nM de cálcio para ser ativada, e esta concentração é equivalente ao nível basal de cálcio intracelular. A NOS-2 ativada produz e libera grandes quantidades de NO (μM) durante longos períodos (ALDERTON, COOPER e KNOWLES, 2001; FERNANDES, 2006). No entanto, alguns tipos celulares podem expressar as três isoformas da NOS, como é o caso dos cardiomiócitos (RUDIGER e SINGER, 2007).

Já foi demonstrada a capacidade de indução da expressão das enzimas constitutivas. Um exemplo de indução da expressão da NOS-1 foi mostrado por SEMENZA (2005), que demonstrou que em condições de hipóxia tecidual prolongada ocorre uma resposta adaptativa através do aumento da expressão e da atividade de uma forma alternativa da NOS-1 para atenuar a vasoconstrição causada pela hipóxia.

A atividade das NOS pode ser regulada por diversos mecanismos. A fosforilação do resíduo de serina (Ser¹¹⁷⁹) da NOS-3 pela proteína Akt resulta no aumento da produção de NO, enquanto a fosforilação da Ser⁸⁴⁷ da NOS-1 por proteínas quinases dependentes de calmodulina diminui a atividade desta enzima. O próprio NO, quando produzido em

quantidades elevadas, atua inibindo sua produção, mecanismo conhecido por retroalimentação negativa (ASSREUY *et al.*, 1993). A interação com outras proteínas também exerce regulação da atividade das NOS. A atividade das enzimas constitutivas pode ser aumentada pela interação com proteínas de choque térmico 90 (hsp90, abreviatura do inglês, *heat shock protein 90*), que atua como um modulador alostérico. No sistema nervoso central a interação da NOS-2 com a proteína calirina parece impedir a dimerização da NOS-2, resultando em uma ação neuroprotetora durante a inflamação. A interação da NOS-1 com a proteína inibidora de NOS (PIN), e o domínio PDZ (ambos no sistema nervoso central e na musculatura esquelética) e a interação da NOS-3 com resíduos de glicina miristoilados e de cisteína palmitoilados na membrana plasmática também regulam a atividade destas enzimas. Além disso, também pode ocorrer a interação das NOS constitutivas com caveolinas (proteínas integrantes das cavéolas formadas de invaginações da membrana plasmática) em células endoteliais e células musculares (ALDERTON, COOPER e KNOWLES, 2001).

A atividade das enzimas NOS catalisa a reação de um átomo de nitrogênio com um átomo de oxigênio resultando na formação de uma espécie química com um elétron desemparelhado ($\dot{\text{NO}}$) definida como radical. A remoção deste elétron do último orbital do NO forma o cátion nitrosônio (NO^+) e a adição de um elétron no orbital forma o ânion nitrosil (NO^-) (LOSCALZO e WELCH, 1995). Estas formas redox de NO são extremamente reativas e possuem meia-vida plasmática curta. Apesar de apresentarem propriedades químicas distintas, são designadas como NO. O NO^+ reage prontamente com grupamentos sulfidríla ($-\text{SH}$) de resíduos de cisteína presentes em inúmeras proteínas formando S-nitrosotióis (RSNO). Os RSNO atuam como reservas bioativas de NO plasmático e tecidual. O NO pode ser transferido dos RSNO para outros tióis vicinais, como a glutatona reduzida (GSH), causando modificações pós-translacionais que modulam a função de várias proteínas (STAMLER, 1994; LOSCALZO e WELCH, 1995; HESS *et al.*, 2005).

A S-nitrosilação de sulfidrila de cisteínas é apontada como a maior responsável pela modulação redox e modificações funcionais de proteínas. Embora exista uma grande quantidade de sulfidrila de cisteína em uma única proteína ou enzima, somente algumas são nitrosiladas devido à especificidade do NO em reagir com resíduos de cisteínas cercados por determinadas sequências de aminoácidos (STAMLER, 1994; SUN, STEENBERGEN e MURPHY, 2006; FOSTER, HESS e STAMLER, 2009). Exemplos de proteínas que

sofrem alteração da funcionalidade devido à nitrosilação de sulfidrilas são canais de K^+ dependentes de cálcio na musculatura lisa vascular (BOLOTINA *et al.*, 1994), NF- κ B (MATTHEWS *et al.*, 1996) e receptores de glicocorticoides (GALIGNIANA, PIWIEN-PILIPUK e ASSREUY, 1999) entre muitas outras (para revisão ver SUN, STEENBERGEN e MURPHY, 2006).

As vias de sinalização entre o NO e o NF- κ B estão intimamente interligadas, no entanto, o significado fisiológico das alterações pós-translacionais que ocorrem com o NF- κ B ainda não foi completamente esclarecido. Estudos mostraram que baixas concentrações de NO (0,1 a 10 μ M) ativam o NF- κ B de leucócitos e macrófagos. Por outro lado, concentrações elevadas desta molécula (200 a 500 μ M) inibem a ativação do NF- κ B em hepatócitos, células T, células endoteliais e musculares lisas e previnem a ligação dos hetero e homodímeros de NF- κ B ao DNA. Outros estudos mostraram ainda que a inibição da produção basal de NO em macrófagos e células endoteliais leva à ativação do NF- κ B. Esta diversidade de resultados sugere que o NO afeta as vias de sinalização do NF- κ B de forma diferente dependendo de cada tipo celular, do estímulo recebido, das espécies e da concentração de NO produzidas e do estado redox da célula (MARSHALL, MERCHANT e STAMLER, 2000). Um estudo que mostra claramente esta questão é o trabalho realizado por CONNELLY e colaboradores (2001), no qual é mostrado que a regulação bifásica do NF- κ B pelo NO explica sua ação pró e antiinflamatória.

A reação do ânion superóxido com o NO gera peroxinitrito, uma molécula com potente ação oxidante e nitrante, indutora da peroxidação lipídica, hidroxilação e oxidação de proteínas (PACHER, BECKMAN e LIAUDET, 2007; SZABÓ, ISCHIROPOULOS e RADI, 2007; LIAUDET, VASSALLI e PACHER, 2009). A reação do NO com o superóxido ocorre até 8 vezes mais rápido que a reação de decomposição do superóxido pela superóxido dismutase, possibilitando a formação de grandes quantidades de peroxinitrito até que esta ERO seja neutralizada. O peroxinitrito tem uma meia-vida de 10 ms e atravessa facilmente as membranas biológicas, alcançando até 2 células adjacentes à sua produção (LIAUDET, VASSALLI e PACHER, 2009). A formação de peroxinitrito em condições fisiológicas é baixa devido à neutralização do superóxido pela superóxido dismutase e à produção de quantidades basais de NO e pode exercer a função de sinalizador intracelular. Contudo, durante processos inflamatórios ocorre um aumento substancial na produção tanto de EROs quanto de NO em quase todos os tipos celulares, o que culmina na produção de grandes

quantidades de peroxinitrito (PACHER, BECKMAN e LIAUDET, 2007; SZABÓ, ISCHIROPOULOS e RADI, 2007; LIAUDET, VASSALLI e PACHER, 2009).

Duas reações fundamentais ocorrem com o peroxinitrito. Uma delas é a reação rápida com o dióxido de carbono (CO_2), um gás abundante nas células, formando o nitrosoperoxycarbonato. Este, por sua vez, é rapidamente degradado a dióxido de nitrogênio (NO_2) e radical carbonato (CO_3^{\bullet}). A outra é a reação com hidrogênio formando ácido peroxinitroso, o qual é também rapidamente degradado a radical hidroxil (OH^{\bullet}) e NO_2 . O produto em comum destas reações reage com NO e forma N_2O_3 , o qual é um importante agente nitrosilante de grupamentos tióis e aminas (SUN, STEENBERGEN e MURPHY, 2006). O peroxinitrito induz também nitração de resíduos de tirosina. Essa reação é iniciada por um mecanismo que retira um átomo de hidrogênio da tirosina e forma um radical tirosil que reage com o NO_2 gerando um dos principais biomarcadores de estresse nitrosativo, a 3-nitrotirosina. A nitração dos resíduos de tirosina afeta a estrutura e a função das proteínas, altera a atividade catalítica de enzimas, interfere na organização do citoesqueleto e prejudica a transdução de sinais intracelulares (PACHER, BECKMAN e LIAUDET, 2007; SZABÓ, ISCHIROPOULOS e RADI, 2007; MORGAN e LIU, 2011).

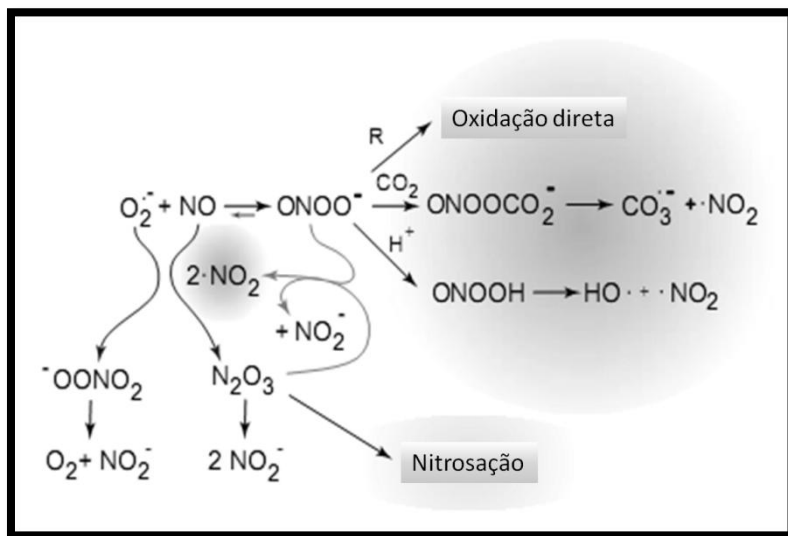


Figura 2. Interações entre o óxido nítrico, ânion superóxido, peroxinitrito e dióxido de nitrogênio. Adaptado de PACHER, BECKMAN e LIAUDET (2007).

Atualmente ainda não se sabe ao certo qual a importância da ação do peroxinitrito sobre o NF- κ B. Estudos publicados nos últimos anos obtiveram resultados contraditórios quanto à ação do peroxinitrito sobre a atividade do NF- κ B em diferentes tipos celulares (PACHER, BECKMAN e LIAUDET, 2007; SZABÓ, ISCHIROPOULOS e RADI, 2007). O estudo realizado por YAKOVLEV e colaboradores (2007) mostrou que a nitração de um resíduo de tirosina do I κ B pelo peroxinitrito pareceu suficiente para dissociá-lo do NF- κ B, aumentando sua atividade em células epiteliais. Já o estudo realizado por PARK e colaboradores (2005) mostrou que o peroxinitrito inibiu a atividade do NF- κ B ao nitrar dois resíduos de tirosina e desestabilizar a p65 de linhagens de células renais. Um terceiro estudo mostrou que o peroxinitrito inibiu completamente a fosforilação da IKK β induzida por LPS e citocinas, mas aumentou a fosforilação da IKK α em uma linhagem de cardiomiócitos e em duas linhagens de células endoteliais (LEVRAND *et al.*, 2005).

1.4 Glicocorticoides

Os glicocorticoides são hormônios esteroides (GC: cortisol no ser humano e corticosterona nos roedores) que circulam sistemicamente e afetam todos os órgãos e sistemas do organismo. Participam da regulação do balanço hidroeletrolítico, da manutenção da fisiologia dos sistemas cardiovascular, imune, renal, nervoso e endócrino além da regulação do metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios. Devido às suas ações anti-inflamatórias e imunossupressoras são descritos como os anti-inflamatórios mais eficazes existentes na clínica e estão entre as classes de medicamentos mais prescritas mundialmente, disponíveis em diferentes formulações e formas farmacêuticas (GUYTON e HALL, 2002; ZHOU e CIDLOWSKI, 2005).

Condições de estresse agudo ou perturbação osmótica estimulam o eixo HPA aumentando a secreção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), o qual atua sobre o córtex da adrenal, levando à rápida liberação de glicocorticoides na corrente sanguínea (em minutos). Algumas citocinas, como IL-6, IL-1 e TNF- α podem estimular diretamente a secreção de ACTH (VENKATARAMAN *et al.*, 2007). Nas células adrenocorticais o ACTH liga-se a um receptor de membrana acoplado à proteína G, chamado receptor ACTH. Desta forma ocorre ativação da adenilato ciclase e elevação da concentração intracelular de cAMP (um segundo mensageiro). As células adrenocorticais, em resposta ao ACTH, aumentam a oferta de colesterol, o substrato das enzimas esteroidogênicas, durante a fase aguda da biossíntese de glicocorticoides que ocorre em poucos segundos após a ativação do receptor ACTH (GUYTON e HALL, 2002).

A maior parte do cortisol liberado na corrente sanguínea é captada pela transcortina, uma globulina fixadora do cortisol, e apenas uma pequena parcela liga-se à albumina sérica (cerca de 94% é transportado na forma fixada e cerca de 6% na forma livre). Em geral os corticoides são fixados nos tecidos alvo ou destruídos dentro de uma ou duas horas. Os esteroides adrenais são degradados no fígado e conjugados para formar glicuronídeos e, em menor extensão em sulfatos. As formas conjugadas destes hormônios são inativas e excretadas na bile e, depois, nas fezes (25%), e na urina (75%) (WILCKENS, 1995; GUYTON e HALL, 2002).

1.4.1 Mecanismos de ação dos glicocorticoides

Os efeitos genômicos dos hormônios corticosteroides ou GC são mediados através de receptores que se situam no citosol. Os GR são membros de uma superfamília de receptores nucleares que incluem os receptores para mineralocorticoides, progesterona, androgênios, estrogênios, hormônios da tireoide, vitamina D e ácido retinóico (SMOAK e CIDLOWSKI, 2004). A afinidade da corticosterona é maior para os receptores para mineralocorticoides e em condições basais mantém estes receptores ocupados. No entanto, em condições moderadas ou severas de estresse os receptores para GC são amplamente ocupados e os efeitos da modificação do padrão de ligação aos receptores esteroides altera as respostas fisiológicas mediadas pelos mesmos (SORRELLS *et al.*, 2009).

Os receptores esteroides são expressos em todos os tipos celulares e estima-se que o número de sítios de ligação de GC varia entre 2.000 e 30.000 por célula (ADCOCK, 2000). Devido à alta lipossolubilidade dos GC, estes atravessam facilmente a membrana plasmática e se ligam aos seus receptores (GR) (ZHOU e CIDLOWSKI, 2005). A ligação dos GC aos seus receptores promove a translocação para o núcleo celular e interação com o DNA. A ativação destes receptores regula a expressão de genes responsivos a GC, promovendo a transcrição e/ou repressão de determinados elementos responsivos aos GC. Devido à interação receptor-DNA e à necessidade de síntese proteica, a resposta clássica induzida por GC não é imediata (ADCOCK, 2000).

Existem duas isoformas de GR, GR α e GR β , que são gerados pelo *splicing* alternativo de um único gene. Ambos são idênticos até a sequência de 727 aminoácidos, a partir de onde começam a divergir. O GR α é acrescido de 50 aminoácidos, totalizando 777 aminoácidos, e é o alvo de ligação com os corticoides, levando à ativação de genes responsivos aos GC. Já a isoforma β totaliza apenas 742 aminoácidos, diferindo do GR α na região C-terminal e não sendo capaz de se ligar aos corticosteroides. A função do GR β ainda não está clara, mas sabe-se que ele também é capaz de se ligar nas regiões responsivas ao glicocorticoide no núcleo da célula (SMOAK e CIDLOWSKI, 2004; LU e CIDLOWSKI, 2004; BARNES, 2006).

O domínio N-terminal é considerado uma região "moduladora" envolvida na regulação da transcrição mediada por receptor. Nesta região existem resíduos de serina passíveis de regulação via

fosforilação. Perto do centro da proteína está um segundo domínio de ligação, uma região altamente básica, enriquecida de resíduos de cisteína, lisina e arginina. Esta região tem aproximadamente 70 aminoácidos e nela está localizado o domínio de ligação do receptor ao DNA (DBD, do inglês, *DNA Binding Domain*). Existem também nesta região duas projeções em forma de dedo, as quais interagem com o DNA, chamadas de "dedos de zinco" (do inglês, *zinc fingers*). Estes dedos de zinco por sua vez, são formados por um átomo de zinco ligado a quatro resíduos de cisteína. O terceiro e último domínio, chamado de domínio de ligação do hormônio (HBD, abreviatura do inglês, *Hormone Binding Domain*) está localizado no extremo C-terminal do receptor, no qual ocorre a ligação dos GC com seus receptores (ADCOCK, 2000; LIMBOURG e LIAO, 2003).

Na ausência do esteroide ligante, o GR forma um complexo proteico no citoplasma associando-se às proteínas de choque térmico (hsp). O complexo é composto por uma molécula do receptor associado a duas moléculas de hsp com 90 kDa cada, as hsp90. A ligação com a hsp90 confere ao receptor uma conformação de alta afinidade de ligação ao esteroide. Já a dissociação que ocorre sob algumas condições, como elevação da temperatura e do pH, promove a alteração da conformação do receptor para um estado de alta afinidade de ligação ao DNA. A ligação do esteroide ao GR promove a dissociação da hsp90 e a translocação do complexo GC/GR para o núcleo. Além da hsp90, outras proteínas como a hsp70 fazem parte do heterocomplexo que forma o GR (ADCOCK, 2000). As hsp existem no citosol independentes de sua ligação com o GR, estando associadas a diversas proteínas, como, por exemplo, as enzimas NOS-1 e NOS-3 (ADCOCK, 2000; ALDERTON, COOPER e KNOWLES, 2001; VAN DER LAAN e MEIJER, 2008).

Uma vez no núcleo, os GR interagem transitoriamente com a hsp56 e ao dissociar-se dessa proteína acessória ligam-se na forma de dímero com seus sítios específicos no DNA, chamados de elementos responsivos ao glicocorticoide (GRES, abreviatura do inglês, *Glucocorticoid Response Elements*). A interação dos GR com os GRES impede alostericamente a expressão de vários genes pró-inflamatórios. O GR pode se ligar também a elementos negativos responsivos ao glicocorticoide (nGRES), que elevam a produção de proteínas inibitórias, como o I κ B α (NISSEN e YAMAMOTO, 2000; ALMAWI e MELEMEDJIAN, 2002; ISMAELI e GARABEDIANN, 2004). A inativação da expressão de genes pró-inflamatórios necessita também das moléculas coativadoras ligadas à sequências específicas de reconhecimento na região promotora dos genes pró-inflamatórios, como

o CBP (abreviatura do inglês, *cyclic AMP response element binding (CREB) binding protein*), p300 e fator associado à p300-CBP, que inibem a acetilação das histonas e com isso impedem a ativação dos genes (BARNES, 2006; DE BOSSCHER e HAEGEMAN, 2009).

Um segundo mecanismo pelo qual os GC podem controlar a expressão de genes é através da interação do tipo proteína-proteína com fatores de transcrição, como o AP-1 e o NF- κ B, e com outros receptores nucleares de hormônios (LIMBOURG e LIAO, 2003; BARNES, 2006; VENKATARAMAN *et al.*, 2007). Este mecanismo foi classificado em dois modelos. O modelo simples é aquele em que o GR se liga a um ponto crítico do fator de transcrição antes que este se ligue ao DNA. Nestes casos, o GR abole a capacidade de ligação dos fatores de transcrição ao DNA sem alterar sua síntese e translocação para o núcleo. Já o modelo composto é aquele em que a ligação entre o GR e o fator de transcrição se dá após a associação do fator ao DNA, podendo ser uma ligação direta ou dependente da presença de co-repressores (ALMAWI e MELEMEDJIAN, 2002). O mecanismo de inibição dos fatores de transcrição pela interação proteína-proteína foi comprovado em pacientes asmáticos que faziam uso de altas doses de corticosteroides que obtiveram melhora da resposta inflamatória não associada à diminuição de ligação do NF- κ B ao DNA (HART *et al.*, 2000).

Um terceiro mecanismo de ação descoberto para os GC é sua ação não-genômica. As primeiras observações de que vários efeitos dos esteroides ocorrem após um curto período de tempo (segundos a minutos) foram na década de 40. Através deste mecanismo, os esteroides modulam a secreção de hormônios, a excitabilidade neuronal, o comportamento, a morfologia celular e o metabolismo de carboidratos, mas principalmente ações relacionadas ao combate à inflamação (LIMBOURG e LIAO, 2003).

A ação não-genômica dos GC pode ocorrer por três mecanismos: através da ação na membrana plasmática independente de receptores; através da mediação por um receptor de GC de membrana e por ações mediadas pelo GR. Estes efeitos dos esteroides envolvem segundos mensageiros clássicos, tais como fosfolipase C (PLC), fosfatidilinositol (IP_3), cálcio, proteína quinase C (PKC) e a família de proteínas fosfatidilinositol-3-quinases (PI_3K/Akt) (VENKATARAMAN *et al.*, 2007). Foi demonstrado por SIMONCINI, GENAZZANI e LIAO (2002) que a ativação desta família de proteínas quinase decorrentes da ativação do receptor para estrogênio (localizado na membrana plasmática) leva ao aumento da

produção rápida de NO pela enzima NOS-3 em células endoteliais de cordão umbilical humano. A ativação não transcricional da NOS-3 é o mecanismo envolvido no efeito vasoprotetor dos estrogênios (LIMBOURG e LIAO, 2003).

1.5 Células musculares lisas

As células musculares lisas (CML) estão presentes nas porções contráteis da maioria das vísceras ocas do organismo, como estômago, intestinos, bexiga urinária e útero, e também nas paredes dos vasos sanguíneos e ductos secretores de glândulas onde é necessária uma contração lenta e sustentada (TORTORA, 2003; GUYTON e HALL, 2002). São mononucleadas, fusiformes e apresentam um citoplasma repleto de feixes de filamentos de actina e miosina orientado de forma oblíqua em relação ao eixo mais longo da célula. Ao contrário das células musculares esqueléticas, as CML não apresentam estriações e seus filamentos de actina e miosina são ancorados em sítios da membrana plasmática e em feixes não contráteis de filamentos intermediários, através de corpúsculos densos de citoplasma. Este arranjo dos filamentos faz com que as CML suportem um tônus sustentado por períodos prolongados e ajudem na propulsão dos conteúdos presentes nas vísceras e nos vasos sanguíneos, tendo em vista que elas contraem simultaneamente e que ocorre redução do comprimento das células durante a contração (GUYTON e HALL, 2002).

O principal fenótipo das CML é o que permite a contração celular e mantém as células com baixas taxas de proliferação. No entanto, estas células exibem grande plasticidade em relação ao fenótipo, podendo em algumas condições patológicas e fisiológicas perder gradativamente a capacidade de contração e passarem a proliferar rapidamente, como ocorre durante a angiogênese (WORTH *et al.*, 2001). Para manter a contratilidade das CML é necessário um conjunto de proteínas contráteis, receptores para agentes vasoconstritores, canais iônicos e moléculas de transdução de sinal (OWENS, 1995). Ao serem colocadas em cultura, geralmente ocorre transição do fenótipo contrátil para o fenótipo proliferativo, gerando uma população de células musculares com menor grau de diferenciação e com alterações morfológicas e eletrofisiológicas (CAMPBELL e CAMPBELL, 1993). Quando o objetivo do estudo não é estudar os mecanismos contráteis deste tipo celular, utilizam-se muito as linhagens celulares. A Figura 4 exhibe a

morfologia típica da linhagem de células musculares lisas vasculares A7r5 utilizadas neste trabalho, em cultura.

Em 1992, GENG e colaboradores demonstraram que células musculares lisas vasculares primárias respondiam à estimulação com IFN e TNF- α produzindo concentrações significativas de NO, evidenciando que estas células além de serem alvo do NO produzido pelas células endoteliais, são também fontes geradoras de NO. Alguns anos depois, foi demonstrado que o citoesqueleto celular é um elemento modulador da ativação da NOS-2 também em células musculares lisas (MARCZIN *et al.*, 1996). As concentrações elevadas de NO, bem como a atividade aumentada do GMPc nos vasos em resposta a endotoxinas e citocinas, estão relacionados com a hipotensão e hiporeatividade a vasoconstritores durante o choque séptico (para revisão ver ASSREUY, 2006).

1.6 Justificativa

A resposta inflamatória é um processo que visa restabelecer a homeostase do organismo quando este é agredido por algum patógeno ou mesmo por alguma condição não infecciosa que cause danos aos tecidos. Esta resposta precisa ser devidamente contida para que não gere ainda mais danos. Durante uma resposta inflamatória, além da produção de citocinas pró-inflamatórias, ocorre a produção de NO por diferentes tipos celulares. Em casos de choque séptico, onde a resposta inflamatória ocorre de forma descontrolada, uma causa importante de óbito dos pacientes decorre em função da hipotensão e hiporreatividade a vasoconstritores. Estes eventos estão intimamente relacionados com as concentrações elevadas de NO produzidas por células do sistema imune e também pelas células musculares lisas, responsáveis pela manutenção do tônus vascular.

Um dos mecanismos mais importantes para controlar a inflamação decorre da atividade dos GC endógenos, que são liberados e produzidos em altas concentrações em situações de estresse. No entanto, existem muitas situações em que os glicocorticoides endógenos e a administração de corticoides exógenos não são capazes de limitar a resposta inflamatória, como no caso de sepse severa, choque séptico e doença obstrutiva pulmonar crônica. Diversos estudos, realizados principalmente com macrófagos e outras células leucocitárias, procuraram encontrar respostas para esta questão. Já foram descritos alguns mecanismos envolvidos na resistência aos GC na doença pulmonar obstrutiva crônica e em raros casos de asma. Foi demonstrado

que o NO é capaz de diminuir a capacidade de ligação dos GC aos seus receptores em fibroblastos (GALIGNIANA, PIWIEN-PILIPUK e ASSREUY, 1999) e que a capacidade de ligação dos GR está prejudicada durante a sepse induzida por CLP ou LPS (DUMA, SILVA-SANTOS e ASSREUY, 2004). Além destes dados, também já foi demonstrada a participação da NOS-3 e do NO por ela produzido na regulação do início da resposta inflamatória em macrófagos. Contudo, os mecanismos envolvidos na resistência à ação dos GC durante a sepse ainda não foram bem esclarecidos. Com base nestes dados e pelos poucos estudos realizados neste contexto em células musculares lisas, este trabalho busca elucidar como ocorre o início da resposta inflamatória, estudar a dinâmica dos GR neste processo e entender porque a reação inflamatória, em alguns casos, não consegue ser contida.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi investigar a participação do NO oriundo das NOS constitutivas no início da ativação celular de células musculares lisas da linhagem A7r5 após estimulação com LPS/IFN e determinar as consequências deste estímulo sobre a dinâmica do NF- κ B e de GR.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar se as células musculares lisas da linhagem A7r5 respondem ao estímulo com LPS/IFN ativando o NF- κ B e produzindo quantidades elevadas de NO.
- Caracterizar a presença e funcionalidade dos GR nas células musculares lisas A7r5.
- Investigar se o estímulo com LPS/IFN altera a concentração intracelular de NO e de EROs nas fases iniciais do processo inflamatório nas células musculares lisas A7r5.
- Identificar as enzimas NOS presentes nas células musculares lisas A7r5.
- Determinar a localização intracelular do NF- κ B e dos GR antes e após estimulação com LPS/IFN em diferentes tempos, utilizando as técnicas de imunofluorescência e imunoelektroforese de proteínas.
- Investigar o papel do NO e de outras espécies reativas, como peroxinitrito, no início da resposta inflamatória nas células musculares lisas A7r5, especialmente sobre o processo de translocação do NF- κ B e dos GR para o núcleo destas células e as possíveis implicações na resistência aos GC.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

As substâncias utilizadas neste estudo foram: lipopolissacarídeo bacteriano de *E. coli* B4 (LPS), albumina bovina fração V (BSA), tripsina, meio de montagem aquoso Gel-Mount®, 7-nitroindazol (7-NI), Hoeschst 33342, sal balanceado de Hank's modificado (em g/L: fosfato de potássio 0.06, cloreto de potássio 0.4, fosfato de sódio dibásico hepta-hidratado 0.09, cloreto de sódio 8.0, D-glicose 1.0, vermelho de fenol 0.011, bicarbonato de sódio 0.35), anticorpo anti- α -actina, fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), coquetel de inibidores de proteases (fluoreto de 4-(2-aminoetil)benzenosulfonil, pepstatina A, bestatina, leupeptina e aprotinina), L-nitroarginina (L-NA), ferroprotoporfirina IX – heme, dexametasona, RU-486, Hepes, glutamina, estreptomicina e dihidrorodamina 123 obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA), Interferon- γ recombinante de rato (IFN) obtido da PeproTech EC (Londres, UK), meio de cultura *Minimal Essential Medium* modificado por Dulbecco (DMEM), soro fetal bovino (SFB) obtidos da GIBCO/Invitrogen Corporation (Nova Iorque, EUA) e Cultilab (Campinas, BR), penicilina obtida da Cultilab (Campinas, BR), anticorpos primários policlonais anti-GR, anti-NF- κ B, anti-NOS-1, anti-NOS-3, anti-NOS-2 obtidos da Santa Cruz Biotechnology (CA, EUA), anticorpos primários monoclonais anti-histona e anti-NF- κ B obtidos da Millipore (Bedford, EUA), anticorpos secundários Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 633 e diacetato de 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoresceína (DAF-FM DA) obtidos da Invitrogen Corporation (Nova Iorque, EUA), sal monopotássico 2-(4-carboxifenil)-4,5-diidro-4,4,5,5-tetrametil-1-imidazolil-1-oxi-3-óxido (PTIO) e cloreto de 5-amino-3-(4-morfolinil)-1,2,3-óxidiazólio (SIN-1) obtidos da Tocris (Michigan, EUA), anticorpo anti-IgG ligado a peroxidase-HRP, kit de quimiluminescência - ECL, padrão de peso molecular, membrana de nitrocelulose obtidos da Amersham (Aylesbury, UK), kit de quimiluminescência SuperSignal® obtido da Thermo Scientific (Massachusetts, EUA), dimetil-sulfóxido (DMSO), NaCl, KCl, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , NaHCO_3 e demais sais de pureza absoluta obtidos da Merck (BR), trinitrato de glicerila (GTN), Cristália Produtos Farmacêuticos (SP, BR), filme radiográfico 18x24 obtido da Trade-Medical Comércio de Materiais Hospitalares (São José, BR).

3.2 Cultura celular

Neste trabalho foram utilizadas células de linhagem de músculo liso vascular obtido de aortas torácicas de embriões de ratos, denominadas A7r5, adquiridas no banco de células da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ. As células foram cultivadas em placas de Petri descartáveis, próprias para cultura, contendo meio DMEM suplementado com 10% (v/v) de SFB, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, 2 mM de glutamina e 10 mM de HEPES; pH 7,4 (doravante chamado apenas de DMEM completo) e mantidas a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. As células foram cultivadas até a 17ª passagem e os repiques realizados a cada 3 – 4 dias, tempo aproximado para as células tornarem-se confluentes.

Para a realização dos repiques todo meio de cultura foi removido e as placas foram lavadas com 6 mL de PBS estéril (em mM: NaCl 137, KCl 2,7, KH₂PO₄ 1,5 e NaH₂PO₄ 10,8; pH 7,4) pré-aquecido. Após a remoção do PBS, cada placa recebeu 1 mL de solução de tripsina (0,25% v/v) /EDTA (0,03% v/v) pré-aquecida a 37°C. Após a digestão enzimática com leve agitação da placa, as células foram transferidas para um tubo cônico contendo 1 mL de DMEM completo que foi centrifugado por 10 minutos à temperatura ambiente (250 g). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensão em 1 mL de DMEM completo, o qual foi utilizado para contagem do número de células, preparação dos demais protocolos experimentais e manutenção da cultura adicionando uma alíquota da suspensão de células em uma nova placa de Petri acrescida de 9 mL de DMEM completo pré-aquecido.

3.3 Avaliação da produção de NO

Para avaliar se as células musculares lisas A7r5 eram capazes de responder à estimulação com LPS (1 µg/mL) e IFN-γ (200 U/mL) - LPS/IFN foram plaqueadas (4×10^4 células/poço) em placas de 96 poços e mantidas *overnight* em DMEM completo para completa adesão. No dia seguinte, as células foram incubadas por 30 minutos com inibidores das enzimas óxido nítrico sintases (7-NI 200 µM e LNA 200 µM) ou um *scavenger* de NO (PTIO 100 µM) antes de serem estimuladas com a mistura LPS/IFN. Este experimento foi realizado em triplicata.

A produção de NO foi avaliada de forma indireta através da quantificação do acúmulo de nitrito presente no sobrenadante da cultura

celular nos tempos de 24, 48 e 72 horas após a ativação. Esta determinação foi realizada através da reação de Griess, cujo reagente consiste em uma parte de sulfanilamida 1% (v/v em água) e uma parte de α -naftil-etilenodiamina 0,1% (v/v em ácido fosfórico 5%), misturados no momento do uso na proporção de 1:1 e a reação é baseada na reação do nitrito presente na amostra, produto estável e não volátil oriundo do NO, com a sulfanilamida, e o acoplamento deste produto com a α -naftil-etilenodiamina, resultando em um azo composto que absorve luz na faixa de 540 a 570 nm. Quantidades iguais do sobrenadante da cultura e do reagente de Griess foram pipetadas em uma placa de 96 poços totalizando 200 μ L. Aguardou-se 10 minutos para estabilização da reação colorimétrica e efetuou-se a leitura da placa em leitor de placas no comprimento de onda de 540 nm. Uma curva padrão de nitrito foi pipetada, em triplicata, e lida simultaneamente ao experimento. Os valores de absorbância do experimento foram interpolados com os valores da curva padrão no programa GraphPad Prism®, obtendo-se desta maneira as quantidades de nitrito produzidas pelas células durante o experimento em μ M. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média.

A intensidade da cor é diretamente proporcional à concentração de nitrito presente na amostra, sendo este protocolo realizado paralelamente aos outros experimentos deste trabalho com a finalidade de obter um indicativo funcional de que as células foram ativadas pelo estímulo e que os resultados doravante encontrados são decorrentes desta ativação.

3.4 Avaliação da viabilidade celular

Este ensaio, descrito por MOSMANN (1983), é um método colorimétrico que se baseia na capacidade de desidrogenases presentes nas mitocôndrias de células viáveis em converterem o sal de dimetiltiazol (MTT), solúvel em água, no cristal formazan, produto insolúvel em água (MOSMANN, 1983). Por isto, o ensaio de MTT foi utilizado como medida indireta da viabilidade celular após o término dos experimentos de detecção de nitrito para avaliar possíveis efeitos citotóxicos dos compostos utilizados.

Após coleta do sobrenadante, os poços foram esvaziados completamente e preenchidos com 200 μ L de DMEM completo contendo 20 μ L de uma solução de MTT 5 mg/mL. As células foram incubadas com esta solução por 3 horas em estufa de CO₂ a 37°C. Após incubação, os poços foram esvaziados novamente e preenchidos com 200 μ L de DMSO para dissolver os cristais de formazan. Realizou-se

então a leitura em leitor de placas em 540 nm e calculou-se a percentagem de células viáveis em relação ao grupo controle do experimento.

3.5 Imunofluorescência

Com a finalidade de determinar a localização intracelular do NF- κ B e dos GR, e verificar se ocorria translocação destes fatores para o núcleo após a estimulação das células com LPS/IFN, foi realizado o ensaio de imunofluorescência. Além de verificar a translocação do NF- κ B e dos GR após o estímulo com LPS/IFN, também investigamos, utilizando ferramentas farmacológicas, possíveis mecanismos que pudessem afetar esta translocação.

As células foram plaqueadas (8×10^4 células/poço) sobre lamínulas de vidro de 12 mm de diâmetro previamente recobertas com gelatina estéril 0,5% (v/v) durante 1 hora a 37°C e dispostas em placas de 12 poços. Vinte e quatro horas após, as células foram incubadas com os compostos descritos na Tabela 1 por 30 minutos antes da estimulação com LPS/IFN, a qual foi mantida por 30 minutos, 2 e 4 horas.

Tabela 1. Grupos experimentais utilizados nos experimentos de imunofluorescência e detecção de NO pela sonda DAF-FM DA.

Grupos experimentais	
1. Controle negativo	5. PTIO 100 μ M
2. LPS/IFN	6. 7-NI + LPS/IFN
3. 7-NI 200 μ M	7. L-NA + LPS/IFN
4. L-NA 200 μ M	8. PTIO + LPS/IFN

Após estes períodos, os poços foram lavados 2 vezes com solução de Hanks estéril e as células fixadas com metanol a 4°C durante 5 minutos. Após a fixação, as células foram lavadas 3 vezes com PBS hipertônico (em mM: NaCl 500, KCl 2,7, KH₂PO₄ 1,5 e NaH₂PO₄ 12; pH 7,4) sob agitação durante 5 minutos, sendo este procedimento adotado para as demais lavagens. As células foram permeabilizadas com uma solução de PBS hipertônico contendo 0,3% (v/v) de TWEEN 20

durante 20 minutos. Um novo ciclo de lavagem foi realizado, utilizando-se a partir desta etapa a solução de PBS hipertônico contendo 0,1% (v/v) de TWEEN 20 (T-PBS) para as lavagens. Sítios inespecíficos foram bloqueados durante 1 hora com 5% (v/v) de soro fetal bovino diluído na solução T-PBS. Após o bloqueio, as lamínulas foram cuidadosamente colocadas com as células para baixo sobre 10 µL de anticorpo primário (anti-NF-κB, 1:100 produzido em camundongo e anti-GR 1:200 produzido em coelho) *overnight* em ambiente úmido e à temperatura ambiente.

Na manhã seguinte, as células foram novamente lavadas com T-PBS, e então, incubadas simultaneamente com 10 µL do anticorpo secundário anti-IgG de coelho marcado com Alexa Fluor 488 (1:500) e 10 µL do anticorpo secundário anti-IgG de camundongo marcado com Alexa Fluor 633 (1:300) durante 2 horas. Uma solução de Hoescht 33342 2,5 mg/mL (0,4 µL adicionados á solução do anticorpo secundário Alexa Fluor 488) foi utilizada para marcar o núcleo das células em azul. Após incubação com os anticorpos secundários, as lamínulas foram lavadas com T-PBS e montadas sobre lâminas de vidro, utilizando-se como meio de montagem o meio aquoso Gel Mount®.

As lâminas prontas foram acondicionadas em ambiente escuro e úmido e mantidas a 4°C até o momento da leitura. A microscopia de fluorescência foi realizada no microscópio confocal Leica® DMI6000 B, na objetiva de imersão em óleo (63x). A aquisição e análise das imagens foram realizadas através do software apropriado (LAS AF Lite®) e os resultados foram expressos em porcentagem em relação ao grupo controle \pm erro padrão da média. Foram utilizados os lasers de diodo, argônio e He-Ne para os respectivos comprimentos de onda 405, 488 e 633 nm.

3.6 Mensuração da produção de NO por sonda fluorescente: DAF-FM DA

Para averiguar o perfil de resposta das CML A7r5 em relação à produção de NO nas primeiras horas após a estimulação com LPS/IFN, foi utilizada a sonda DAF-FM DA (5 µM) capaz de detectar concentrações de NO a partir de 3 nM. Esta sonda, desenvolvida por KOJIMA e colaboradores (1999), atravessa a membrana celular de forma passiva e dentro da célula é desacetilada por esterases gerando DAF-FM. O DAF-FM ao reagir com NO, gera um benzotriazol fluorescente, obtendo-se dessa forma uma relação linear entre a

intensidade de fluorescência e a formação de NO na amostra (KOJIMA *et al.*, 1999).

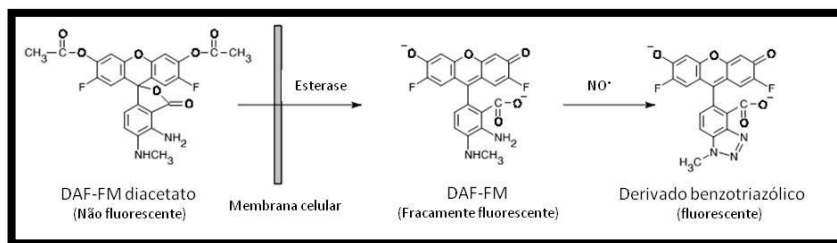


Figura 3. Esquema de detecção de NO pelo composto DAF-FM DA e DAF-FM. Adaptado de INVITROGEN (2001).

As células foram plaqueadas (4×10^4 células/poço) em placas de 96 poços pretas estéreis com fundo transparente e mantidas *overnight* em meio DMEM completo para adesão. No dia seguinte, os poços foram lavados 3 vezes com solução de Hanks e, em seguida, as células foram incubadas por 1 hora com meio DMEM sem soro a 37°C em estufa de CO₂. Os poços foram lavados novamente com solução de Hanks e as células incubadas com 50 µL da sonda DAF-FM DA (5 µM) durante 30 minutos à temperatura ambiente e protegidas da luz. Após incubação, os poços foram lavados com Hanks para remover o excesso extracelular da sonda. As células foram incubadas por 30 minutos com os compostos 7-NI (200 µM), L-NA (200 µM) e PTIO (100 µM), conforme a Tabela 1, antes de serem estimuladas com LPS/IFN. Nos tempos de 30 minutos, 2 e 4 horas foram realizadas leituras em um fluorímetro (TECAN Infinite 2000, Suíça), com comprimento de onda de excitação de 485 nm e emissão de 515 nm. Os comprimentos de onda de excitação e emissão da sonda DAF-FM DA são 488 nm e 515 nm, respectivamente. Os resultados foram expressos em vezes de aumento de intensidade de fluorescência em relação ao grupo controle \pm erro padrão da média.

3.7 Mensuração da produção de EROs por sonda fluorescente

A produção de EROs nas CML A7r5 foi analisada por microscopia de fluorescência através do monitoramento da oxidação da dihidrorodamina 123 (DHR) à rodamina. As células foram plaqueadas (8×10^4 células/poço) em placas de 12 poços e mantidas *overnight* em DMEM completo para adesão. No dia seguinte, as células foram lavadas

3 vezes com solução de Hanks e os poços preenchidos com DMEM sem soro e incubadas por 1 hora a 37°C em estufa de CO₂. Após este período as células foram novamente lavadas com solução de Hanks e o meio sem soro foi repostado, e as células foram incubadas por 30 minutos com a sonda fluorescente DHR123 protegidas da luz. Após esta incubação as células foram lavadas com solução de Hanks, os poços preenchidos com Hanks e então as células foram incubadas com LPS/IFN e/ou doadores de NO e de EROs, conforme mostrado na Tabela 2. As concentrações dos reagentes e os tempos de incubação foram baseados em dados anteriores da literatura. Ao final dos tempos de incubação as células foram levadas ao microscópio de fluorescência invertido (Olympus IX71, Tóquio, Japão) e as imagens adquiridas com a câmera acoplada ao microscópio, objetiva de 40x, no comprimento de onda de excitação de 500 nm e emissão de 536 nm.

Tabela 2. Grupos experimentais utilizados no experimento de mensuração da produção de EROs por sonda fluorescente.

Grupos experimentais	
1. Controle negativo	6. GSNO 1 µM + LPS 1 µg/mL
2. GTN 1 µM	7. Heme 10 µM
3. GSNO 1 µM	8. Heme 10 µM + LPS 1 µg/mL
4. LPS 1 µg/mL	9. Heme 10 µM + LPS 1 µg/mL
5. GTN 1 µM + LPS 1 µg/mL	

3.8 Imunoeletroforese (Western blotting) – Preparação das amostras

Para avaliar a expressão de diferentes proteínas foi realizado um protocolo de lise celular adequado para obtenção de um extrato total e de um extrato nuclear das CML A7r5.

Extrato nuclear: Foram plaqueadas 2×10^6 células em placas de 60 mm de diâmetro e mantidas em estufa de CO₂ por 20 horas com DMEM completo. Após adesão, as células foram tratadas conforme descrito na Tabela 3, sendo cada placa correspondente a um grupo experimental. As concentrações dos reagentes foram baseadas em dados da literatura.

Tabela 3. Grupos experimentais utilizados nos experimentos de imunoelektroforese.

Grupos experimentais	
1. Controle negativo	7. L-NA + LPS/IFN
2. LPS/IFN	8. PTIO + LPS/IFN
3. 7-NI 200 μ M	9. GTN 10 μ M
4. L-NA 200 μ M	10. Heme 10 μ M
5. PTIO 100 μ M	11. SIN-1 100 μ M
6. 7-NI + LPS/IFN	

Os tempos de incubação do grupo LPS/IFN foram de 30 minutos, 2 horas e 4 horas. Para os demais grupos o tempo de incubação foi de 2 horas e o tempo de incubação dos inibidores das NOS e do *scavenger* de PTIO foi de 30 minutos antes da estimulação com LPS/IFN.

Foram preparados o tampão A (HEPES 10 mM, KCl 10 mM, EDTA 0,1 mM, EGTA 0,1 mM, pH 7,9 e DTT 1 mM) e o tampão C (HEPES 20 mM, NaCl 0,4 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, pH 7,5 e DTT 1 mM), sendo os dois acrescidos de um coquetel de inibidores de proteases (1:500) e PMSF 200 mM (1:500) imediatamente antes do uso. Ao término dos períodos de incubação, todo o meio de cultura foi removido das placas e as mesmas foram lavadas com 10 mL de PBS gelado, mantendo-as sobre gelo. Foram adicionados 900 μ L de tampão A gelado em cada placa e as mesmas foram incubadas no gelo durante 15 minutos. Após este período as células foram raspadas com auxílio de um raspador e transferidas para tubos de 2 mL previamente numerados. Estes tubos receberam 100 μ L de NP40 5% (v/v) e foram então homogeneizados e centrifugados a 12.000 g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante (extrato citoplasmático) foi transferido para uma série de tubos a parte, foi dosada a quantidade de proteína presentes nas amostras e então adicionado 1 parte do tampão de amostra concentrado (SDS 10%, glicerol 20%, DTT 10 mM, Tris-HCl 0,5 M, azul de bromofenol 2 mg) para cada 5 partes de amostra. As amostras contendo o extrato citoplasmático foram fervidas por 5 minutos e armazenadas em freezer -

20°C. As paredes dos tubos contendo os pellets resultantes da primeira centrifugação foram cuidadosamente secas com papel filtro e os pellets ressuspensos em 50 µL de tampão C gelado. Estas amostras foram incubadas no gelo durante 30 minutos e centrifugadas a 12.000 g por 10 minutos a 4°C. Esse sobrenadante (extrato nuclear) foi transferido para um novo tubo, do qual se separou uma alíquota para a dosagem de proteínas e ao restante adicionou-se tampão de amostra concentrado (1:6). As amostras de extrato nuclear foram fervidas durante 5 minutos e congeladas a -20°C até o momento do uso.

Extrato total: Foram plaqueadas 2×10^6 células em placas de 60 mm de diâmetro e mantidas em estufa de CO₂ por 20 horas com DMEM completo. Após adesão, cada placa recebeu um tratamento, sendo os grupos experimentais e os tempos de incubações os mesmos descritos para o item extrato nuclear. Ao término dos períodos de incubação o meio de cultura foi removido das placas e as mesmas foram lavadas com 10 mL de PBS gelado, mantendo-as sobre gelo. Foram adicionados 800 µL por placa de tampão RIPA (Na₂HPO₄ 9,1 mM; NaH₂PO₄ 1,7 mM; NaCl 150 mM; NP-40 1% (v/v); deoxicolato de sódio 0,5% (v/v); SDS 0,1% (v/v), pH 7,4) gelado contendo coquetel de inibidores de proteases (1:500) e PMSF 200 mM (1:500) e as mesmas foram incubadas no gelo por 15 minutos sob agitação vigorosa ocasional. Após este período, as células foram raspadas com auxílio de um raspador e transferidas para tubos de 2 mL previamente numerados. Todos os tubos foram incubados no gelo durante 40 minutos, centrifugados a 14.000 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo, do qual se separou uma alíquota para a dosagem de proteínas e ao restante adicionou-se tampão de amostra concentrado (1:6). As amostras de extrato total foram fervidas durante 5 minutos e congeladas a -20°C até o momento do uso.

A concentração de proteínas das amostras foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), utilizando-se uma curva padrão de BSA, em triplicata, para interpolação dos resultados no programa GraphPad Prism®.

3.9 Western blotting – Separação de proteínas e imunodeteção

As proteínas (10 - 20 µg/canaleta) foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS-PAGE. Foi utilizado um gel de separação (acrilamida 30% (v/v), bis-acrilamida 0,8% (v/v), Tris-HCl 1,5 M, SDS 10% (v/v), TEMED 0,08% (v/v) e persulfato de amônia

10% (v/v); pH 8,8) e um gel de entrada (acrilamida 30% (v/v), bis-acrilamida 0,8% (v/v), Tris-HCl 0,5 M, SDS 10% (v/v), TEMED 0,08% (v/v) e persulfato de amônia 10% (v/v); pH 6,8). A eletroforese foi realizada em cuba específica com voltagem fixa de 90 V, por aproximadamente 3 horas, utilizando-se tampão de corrida composto de glicina 192 mM, Tris 12,5 mM e SDS 1% (v/v).

Após a eletroforese, foi montado um “sanduíche” para realizar a transferência das proteínas dos géis para membranas de nitrocelulose, as quais foram imersas por 15 minutos em tampão de transferência contendo metanol antes de iniciar a transferência. As proteínas foram transferidas do gel para a membrana num aparato de eletrotransferência da Bio-Rad, no sentido do polo negativo para o polo positivo com uma voltagem fixa de 100 V. Em seguida, as membranas foram coradas com Vermelho de Ponceau 0,2% (v/v) em ácido tricloroacético 3% (v/v) para visualização das proteínas. Após 3 lavagens de 10 minutos sob agitação constante com TBS-T (Tris-HCl 20 mM, NaCl 500 mM, contendo 0,05% (v/v) de Tween 20, pH 7,5) para a retirada do excesso do corante. Após estas lavagens os sítios inespecíficos nas membranas foram bloqueados com uma solução de TBS-T contendo 5% de leite desnatado durante 1 hora à temperatura ambiente sob agitação. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas com anticorpos específicos anti-GR (1:1000), anti-NF- κ B (1:500), anti-NOS-1 (1:500), anti-NOS-3 (1:500), anti-histona (1:500) ou anti- α -actina (1:50.000) *overnight* a 4°C. Ao término do período de incubação as membranas foram lavadas 3 vezes com TBS-T durante 10 minutos sob agitação, e incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG conjugado com peroxidase (1:5000 em TBS-T com 5% de leite desnatado) por 1 hora à temperatura ambiente. O excesso de anticorpo foi retirado através de lavagens com TBS-T para então realizar-se a revelação em filme radiográfico através de kit de quimiluminescência e máquina reveladora. As medidas de imunoc conteúdo das proteínas de interesse foram determinadas por densitometria das bandas, através do programa ImageJ® e análise estatística realizada com o programa GraphPad Prism® (San Diego, CA, USA), sendo os resultados expressos como porcentagem em relação ao grupo controle \pm erro padrão da média.

3.10 Análise estatística

Os resultados foram expressos de maneira singular para cada protocolo experimental e as análises estatísticas foram todas realizadas

por análise de variância (ANOVA), de uma ou duas vias, seguido do pós-teste de Tukey. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos, sendo todos os testes estatísticos realizados com o programa GraphPad Prism® (San Diego, CA, USA).

4 RESULTADOS

4.1 Produção de NO por células musculares lisas A7r5 estimuladas com LPS/IFN

As CML A7r5 estimuladas com LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) e IFN (200 U/mL) responderam ao estímulo produzindo quantidades elevadas de NO, uma vez que a concentração de nitrito, seu principal metabólito, aumentou de forma tempo-dependente no sobrenadante da cultura celular, conforme mostrado na Figura 4. O processo de ativação celular não foi citotóxico, pois a viabilidade celular medida através da taxa de proliferação mitocondrial não foi afetada significativamente até o término do experimento, 72 horas após a estimulação (Figura 5).

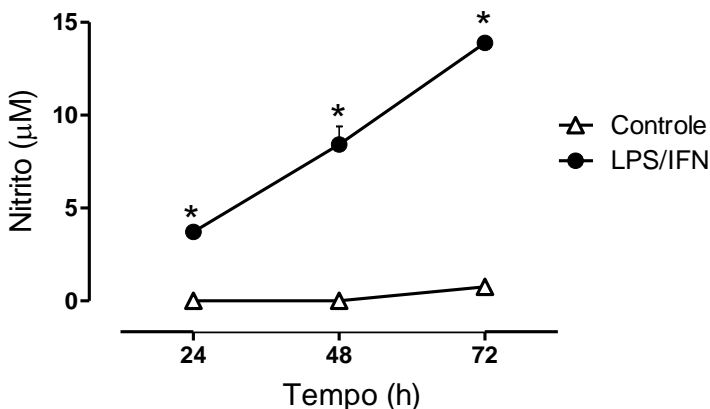


Figura 4. Curso temporal da produção de NO por células musculares lisas A7r5 estimuladas com LPS/IFN por 24, 48 e 72 horas. Culturas confluentes foram estimuladas com LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) e IFN (200 U/mL) e 24, 48 e 72 horas após estimulação o sobrenadante da cultura foi coletado para quantificação de nitrito. Os grupos controle receberam volumes iguais de PBS. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média, de triplicatas e 3 experimentos distintos. A concentração de nitrito observada nos grupos controle em 24 e 48 horas foi abaixo do limite de detecção da reação, sendo atribuído o valor de 0. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

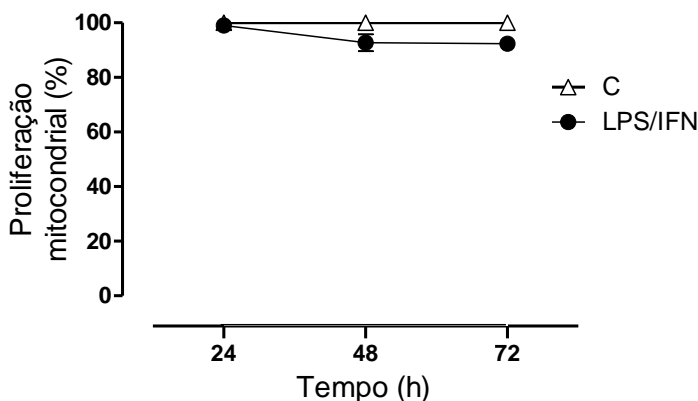


Figura 5. Avaliação da viabilidade celular pela taxa de proliferação mitocondrial durante o processo de ativação celular. Culturas confluentes de células musculares lisas A7r5 foram estimuladas com LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) e IFN (200 U/mL) e 24, 48 e 72 horas após estimulação o sobrenadante da cultura foi totalmente coletado para quantificação de nitrato. As células de cada poço foram incubadas com solução de MTT 5 mg/mL por 3 horas e posteriormente incubados com DMSO por 15 minutos. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média, em porcentagem em relação ao controle, de triplicatas e 3 experimentos distintos. Os valores dos grupos controle foram considerados como 100 % de proliferação mitocondrial. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

4.2 Formação de EROs durante a ativação celular e influência de doadores de NO

Considerando que o LPS é um estímulo eficaz para induzir a produção de EROs (PAWATE *et al*, 2004; GINNAN *et al*, 2008), nosso próximo passo foi avaliar se o LPS induzia a produção destas espécies nas CML A7r5. Como pode ser observado, a estimulação das CML A7r5 com LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) aumentou a produção de EROs de forma tempo-dependente, tanto em 2 horas (Figura 6), quanto em 4 horas (Figura 7). Como estímulo-padrão ou controle positivo da produção de EROs foi utilizado o grupamento heme (GRAÇA-SOUZA *et al.*, 2002). Comparativamente, o LPS foi um estímulo mais eficaz que o heme em induzir a produção de EROs nestas células.

O doador de NO, GSNO, é um nitrosotiol que libera NO em solução quando na presença de outros tióis (como resíduos $-\text{SH}$ de cisteínas

proteicas ou não) ou de metais, como Fe^{2+} . O GTN, por sua vez, é uma pró-droga que é bioativada pelas células do tecido vascular liberando NO independente da presença de tióis (FEELISCH e NOACK, 1987). A incubação das células com os doadores de NO não modificou o padrão de fluorescência basal das células (Painéis B e C, Figuras 6 e 7). Todavia, ambos causaram substancial redução da fluorescência induzida tanto pelo LPS quanto pelo heme. Este efeito de redução da fluorescência foi mais evidente 4 horas após a ativação com LPS.

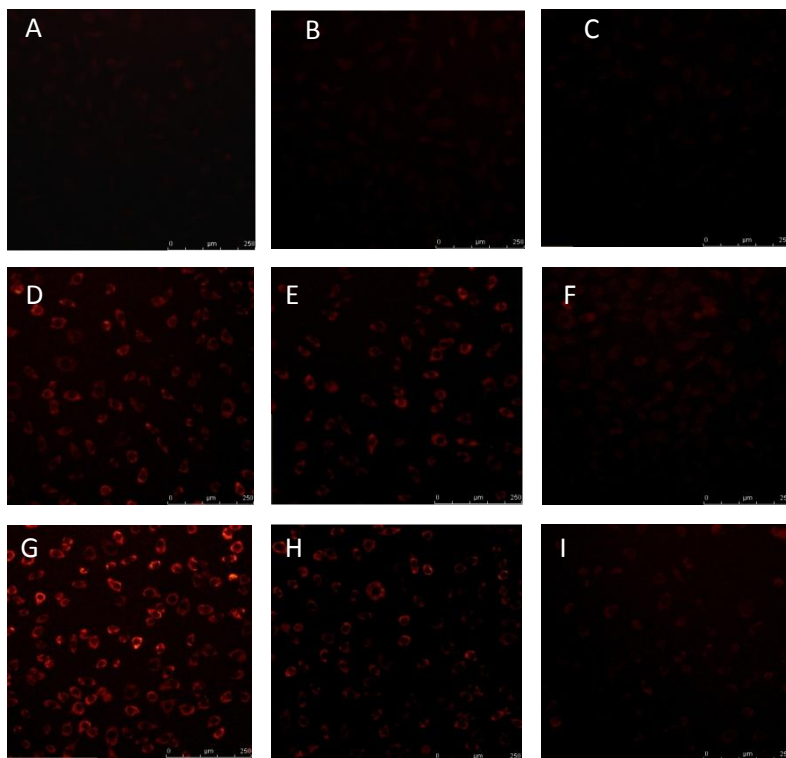


Figura 6. Produção de EROs em células musculares lisas A7r5 2 horas após estimulação com LPS e heme e interferência de doadores de NO. As imagens representam a produção de EROs detectada pela sonda fluorescente DHR123 após 2 horas de estimulação com LPS 1 $\mu\text{g/mL}$, GTN 1 μM e GSNO 1 μM . Os grupos E, F, H e I foram incubados GTN e GSNO, respectivamente, por 30 minutos antes da estimulação com LPS ou heme. Imagens adquiridas em microscópio invertido de fluorescência com aumento de 200x. A) Controle; B)

GTN; C) GSNO; D) LPS; E) GTN + LPS; F) GSNO + LPS; G) heme; H) GTN + heme; I) GSNO + heme.

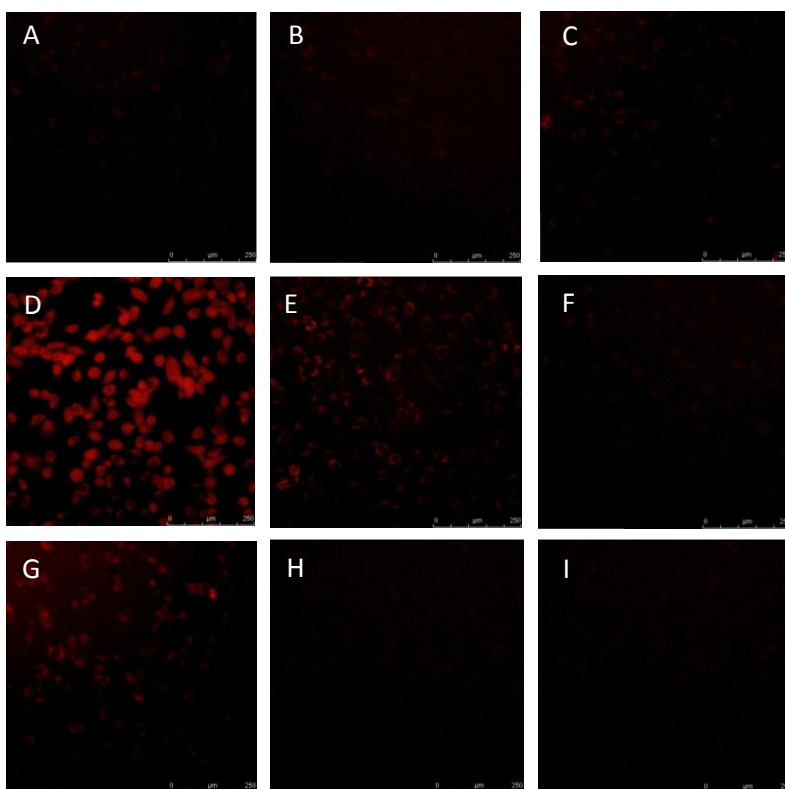


Figura 7. Produção de EROs em células musculares lisas A7r5 4 horas após estimulação com LPS e heme e interferência de doadores de NO. As imagens representam a produção de EROs detectada pela sonda fluorescente DHR123 após 4 horas de estimulação com LPS 1 $\mu\text{g/mL}$, GTN 1 μM e GSNO 1 μM . Os grupos E, F, H e I foram incubados GTN e GSNO, respectivamente, por 30 minutos antes da estimulação com LPS ou heme. Imagens adquiridas em microscópio invertido de fluorescência com aumento de 200x. A) Controle; B) GTN; C) GSNO; D) LPS; E) GTN + LPS; F) GSNO + LPS; G) heme; H) GTN + heme; I) GSNO + heme.

4.3 Caracterização da presença e funcionalidade dos receptores de GC

O passo seguinte foi investigar a presença e funcionalidade dos receptores de glicocorticoides (GR). A incubação das células com concentrações crescentes de dexametasona, um glicocorticoide sintético agonista dos GR, 3 horas antes da estimulação com LPS/IFN reduziu o acúmulo de nitrito no sobrenadante da cultura celular (Figura 8). Desta forma, foi demonstrado que as CML A7r5 possuem GR funcionais.

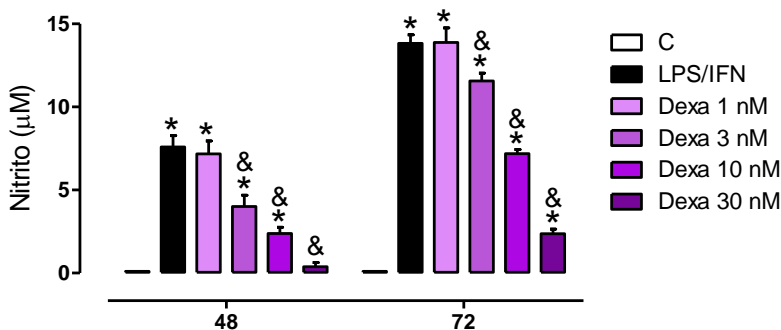


Figura 8. Inibição da ativação celular por concentrações crescentes de dexametasona. O gráfico representa a quantificação de nitrito 48 e 72 horas após estimulação com LPS/IFN (LPS 1 µg/mL e IFN 200 U/mL) na presença e na ausência de concentrações crescentes de dexametasona (1 – 30 nM) incubadas por 3 horas antes da estimulação com LPS/IFN de triplicatas e média de 3 experimentos distintos. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle e & $p < 0,05$ em relação ao grupo LPS/IFN.

Outra demonstração de que os GR são funcionais foi obtido com a utilização de um antagonista destes receptores, o RU-486. As células foram incubadas com concentrações crescentes do antagonista (10, 100 e 1000 nM) 1 hora antes do tratamento com dexametasona (30 nM) e 4 horas antes da estimulação com LPS/IFN. Observou-se que o antagonista dos GR reverteu o efeito inibitório da dexametasona, permitindo a ativação celular (Figura 9). A incubação com dexametasona e RU-486 não afetou significativamente a viabilidade celular medida pela taxa de proliferação mitocondrial (Figura 10, Painéis A e B).

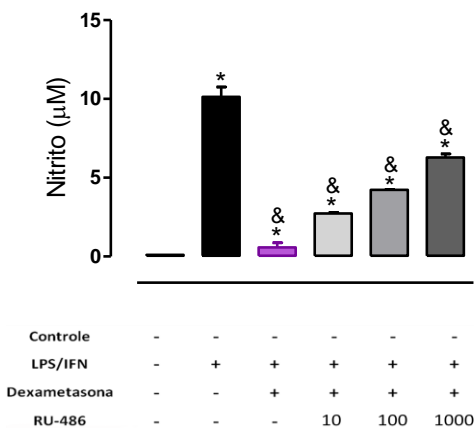


Figura 9. Reversão do efeito inibitório da ativação celular da dexametasona por concentrações crescentes do antagonista de GR, RU-486. O gráfico representa a quantificação de nitrito 48 horas após estimulação com LPS/IFN (LPS 1 µg/mL e IFN 200 U/mL) na presença e na ausência de dexametasona e de RU486. O antagonista (10, 100 e 1000 nM) foi adicionado 1 hora antes da dexametasona (30 nM) e 4 horas antes da estimulação com LPS/IFN de triplicatas e média de 3 experimentos distintos. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle e & $p < 0,05$ em relação ao grupo LPS/IFN.

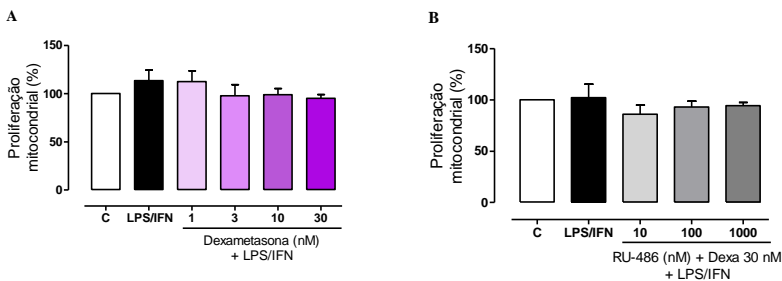


Figura 10: Avaliação da viabilidade celular pela taxa de proliferação mitocondrial em células musculares lisas A7r5 incubadas com dexametasona e RU-486 e estimuladas com LPS/IFN por 48 horas. A) Culturas confluentes foram incubadas com concentrações crescentes de dexametasona (nM) por 3 horas e estimuladas com LPS/IFN (LPS 1 µg/mL e IFN 200 U/mL) por 48. B) Culturas confluentes foram incubadas com concentrações crescentes de RU-486 (nM) e 1 hora após foi adicionada dexametasona (30 nM) por 3 horas. Após este período as células foram estimuladas com LPS/IFN (LPS 1 µg/mL e IFN 200 U/mL) por 48. (A e B) O

sobrenadante foi retirado e as células incubadas com solução de MTT 5 mg/mL por 3 horas e posteriormente incubados com DMSO por 15 minutos. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média, em porcentagem em relação ao controle, de triplicatas e 3 experimentos distintos. Os valores dos grupos controle foram considerados como 100 % de proliferação mitocondrial.

* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

4.4 Dependência da produção inicial de NO para a ativação celular

O passo seguinte foi investigar se a estimulação das CML A7r5 com LPS/IFN poderia promover a liberação de NO nos períodos iniciais da ativação celular. Para isto, foi utilizada a sonda fluorescente DAF-FM DA (5 μ M). Trinta minutos após a estimulação com LPS/IFN, as CML A7r5 triplicaram a produção de NO em relação às células não estimuladas (Figura 11). Este resultado evidencia que a ativação celular induz uma liberação muito rápida de NO, chamada de pulso de NO.

Com o objetivo de confirmar que a produção inicial de NO estava envolvida no processo de ativação celular foi utilizada uma abordagem farmacológica. As células previamente incubadas com inibidores das NOS (7-NI 200 μ M e L-NA 200 μ M) ou com um *scavenger* de NO (PTIO 100 μ M) produziram quantidades significativamente menores de NO quando comparadas ao grupo que recebeu somente o estímulo, como mostra a Figura 11. Os tratamentos não afetaram significativamente a viabilidade celular (dados não mostrados). Observou-se também que os grupos que receberam apenas L-NA ou o *scavenger* de NO apresentaram um aumento significativo na intensidade de fluorescência. Este fato é decorrente da autofluorescência dos compostos no comprimento de onda utilizado (excitação 485 nm e emissão 515 nm) e em células não estimuladas. No entanto, ao reagirem com o NO geram produtos não fluorescentes (GOLDSTEIN, RUSSO e SAMUNI, 2003)

A incubação das células com 7-NI, L-NA e PTIO, além de reduzirem a produção inicial de NO, reduziram de forma significativa o acúmulo de nitrito no sobrenadante da cultura celular 48 horas após a estimulação (Figura 12). Estes resultados indicam que o pulso de NO produzido minutos após a estimulação com LPS/IFN está intimamente relacionado com o processo de ativação celular, ou seja, indução da expressão de proteínas pró-inflamatórias, como a enzima NOS-2 e, conseqüentemente, a produção de grandes quantidades de NO.

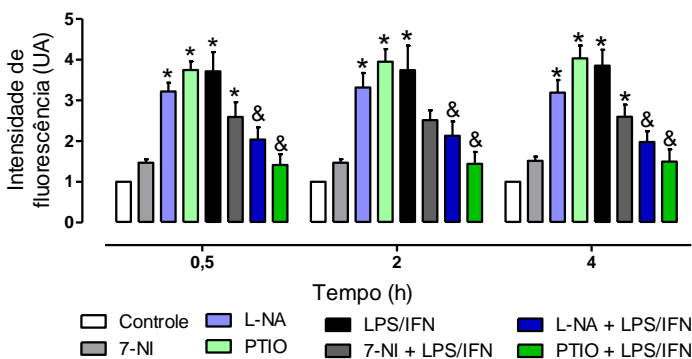


Figura 11. Curso temporal e efeito de inibidores das NOS na produção inicial de NO em células musculares lisas medida por fluorescência. O gráfico representa a produção inicial de NO avaliada através da sonda fluorescente DAF-FM DA (5 μ M) de triplicatas e média de 3 experimentos distintos. A intensidade de fluorescência apresentada no gráfico é diretamente proporcional à concentração de NO presente nas amostras. Os inibidores 7-NI (200 μ M) e L-NA (200 μ M) e o *scavenger* de NO, PTIO (100 μ M), foram incubados por 30 minutos antes da estimulação das células com LPS/IFN (LPS 1 μ g/mL e IFN 200 U/mL). * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle e & $p < 0,05$ em relação ao grupo LPS/IFN.

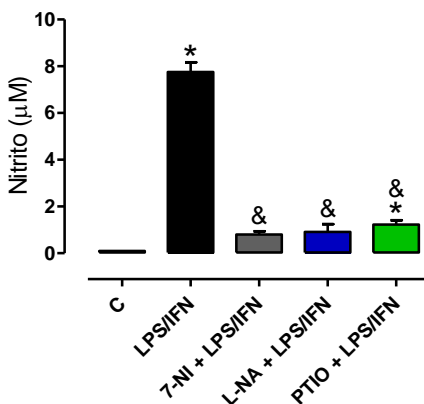


Figura 12. Efeito da inibição da produção inicial de NO no acúmulo de nitrito no sobrenadante da cultura celular. O gráfico representa a quantificação de nitrito 48 horas após a estimulação com LPS/IFN (LPS 1 μ g/mL e IFN 200 U/mL) na presença e na ausência de 7-NI, L-NA e PTIO em triplicatas e média de 3 experimentos distintos. Os inibidores 7-NI (200 μ M) e L-NA (200 μ M) e o *scavenger* de NO, PTIO (100 μ M) foram incubados por 30

minutos antes da estimulação com LPS/IFN e mantidos até o momento da coleta do sobrenadante da cultura, 48 horas após a estimulação com LPS/IFN. Os grupos 7-NI, L-NA e PTIO não foram estatisticamente diferentes do grupo controle e foram agrupados. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle e & $p < 0,05$ em relação ao grupo LPS/IFN.

4.5 Imunoelctroforese para NOS-1 e NOS-3

Considerando que as CML A7r5 triplicaram a produção de NO 30 minutos após a estimulação com LPS/IFN, foi realizada a técnica de imunoelctroforese com o extrato total das células para investigar qual enzima poderia ser responsável pela produção inicial de NO. Como mostrado na Figura 13, estas células expressam as duas isoformas constitutivas da NOS.

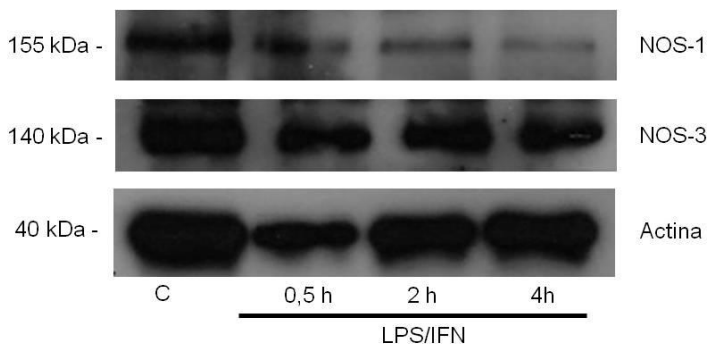


Figura 13. Presença de NOS-1 e NOS-3 no extrato total de células musculares lisas A7r5 avaliada por imunoelctroforese. As imagens representam a expressão da NOS-1 e NOS-3 em células musculares lisas A7r5 antes e após a estimulação com LPS/IFN. As células foram incubadas com LPS/IFN (LPS 1 $\mu\text{g/mL}$ e IFN 200 U/mL) por 0,5, 2 e 4 horas e preparados extratos totais.

4.6 Imunocitoquímica: Translocação nuclear do NF- κ B e dos GR, seu curso temporal e envolvimento de NO

As CML A7r5 estimuladas com LPS/IFN são ativadas produzindo concentrações elevadas de NO, sendo um indicativo funcional da atividade da enzima NOS-2. A expressão desta enzima é dependente da ativação do NF- κ B e da sua translocação nuclear, cuja atividade é regulada pela atividade dos GR. Em função desta relação, investigamos

o curso temporal da translocação nuclear do NF- κ B e o comportamento dos GR após a estimulação das CML A7r5 com LPS/IFN.

Conforme mostram as Figuras 14 e 15, respectivamente, a ativação celular foi acompanhada da translocação nuclear do NF- κ B, e surpreendentemente, também de GR. A translocação do NF- κ B aumentou rapidamente após a estimulação com LPS/IFN e retornou aos níveis basais 4 horas após a ativação (Figura 14). De forma surpreendente, um perfil de translocação similar foi observado para os GR (Figura 15).

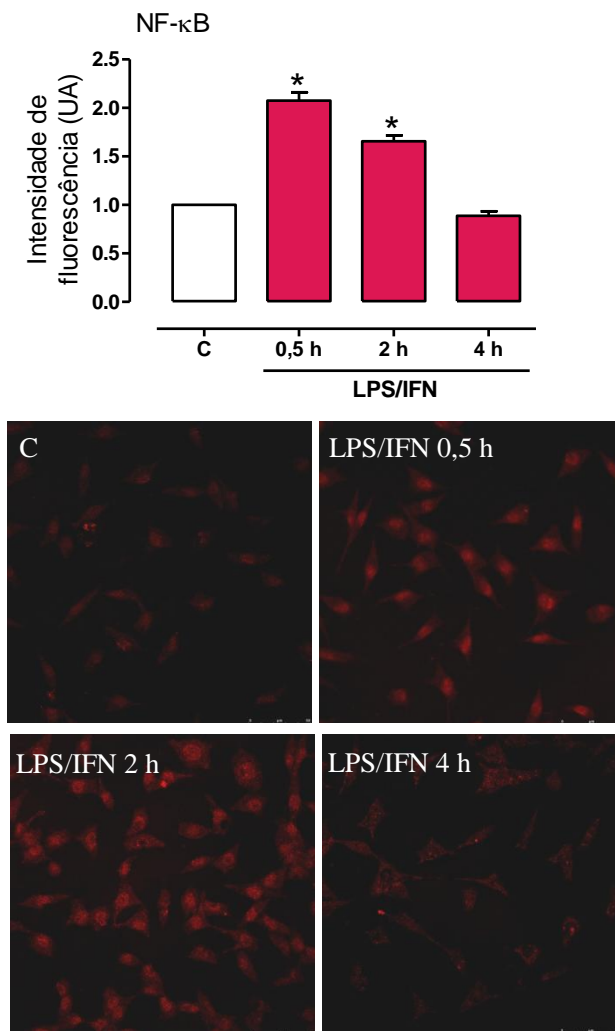


Figura 14. Quantificação e ilustração da translocação nuclear de NF- κ B 0,5, 2 e 4 horas após estimulação com LPS/IFN. O gráfico representa a quantificação da translocação nuclear de NF- κ B após estimulação com LPS/IFN (LPS 1 μ g/mL e IFN 200 U/mL). As imagens ilustram essa translocação e foram adquiridas em microscópio de fluorescência Confocal com aumento de 630x em óleo de imersão e quantificadas com o Software LAS AF Lite®. Resultados expressos em porcentagem em relação ao grupo controle. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

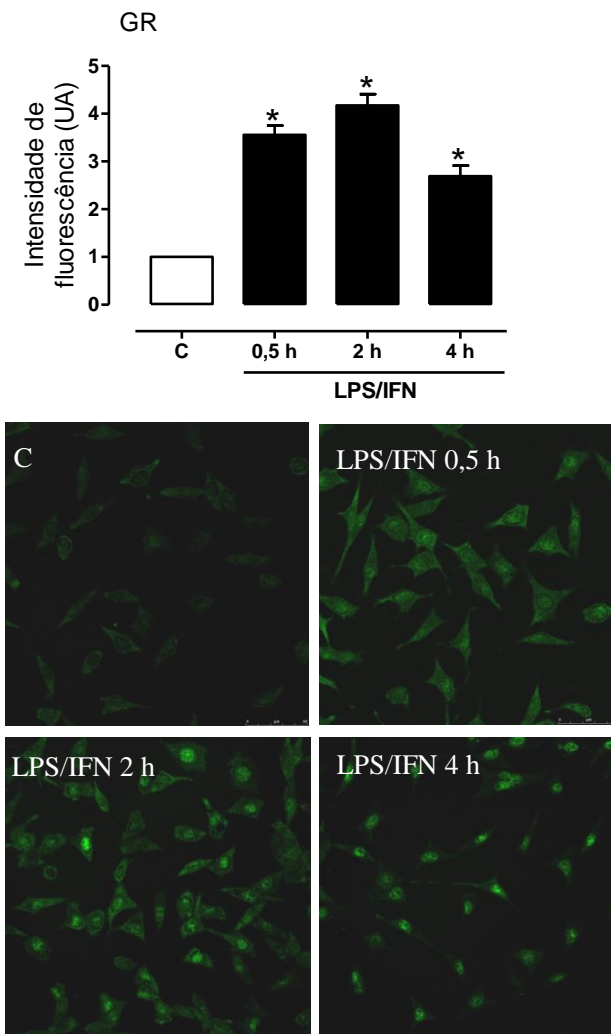


Figura 15. Quantificação e ilustração do curso temporal de translocação nuclear de GR após estimulação com LPS/IFN. O gráfico representa a quantificação da translocação nuclear de GR após estimulação com LPS/IFN (LPS 1 $\mu\text{g/mL}$ e IFN 200 U/mL). As imagens ilustram essa translocação e foram adquiridas em microscópio de fluorescência Confocal com aumento de 630x em óleo de imersão e quantificadas com o Software LAS AF Lite®. Resultados expressos em porcentagem em relação ao grupo controle. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

A Figura 16 mostra a sobreposição das imagens das imunofluorescências para NF- κ B (vermelho) e GR (verde), sendo possível evidenciar pontos amarelos que sugerem haver colocalização entre os dois fatores analisados.

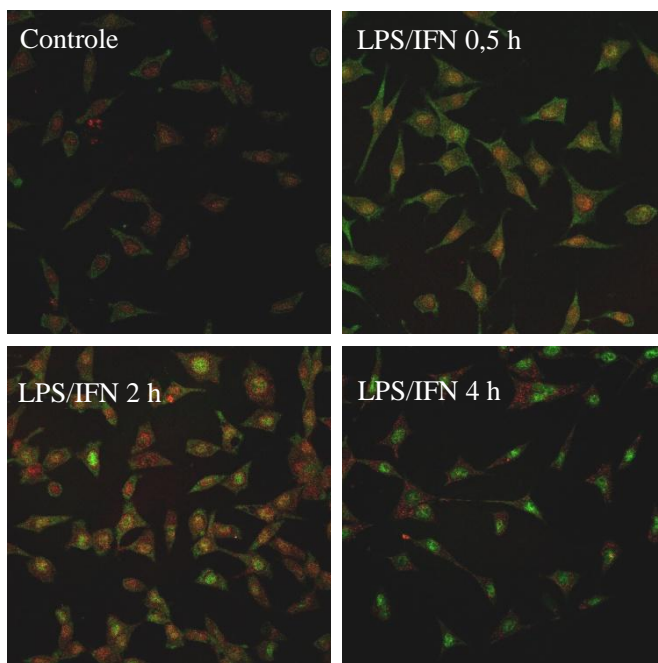


Figura 16. Ilustração da sobreposição do curso temporal de translocação nuclear de NF- κ B e GR após estimulação com LPS/IFN. As imagens representam a imunofluorescência para NF- κ B realizada com Alexa Fluor 564 (vermelho) e para GR com Alexa Fluor 488 (verde). As concentrações de LPS/IFN utilizadas foram LPS 1 μ g/mL e IFN 200 U/mL. As imagens foram adquiridas em microscópio de fluorescência Confocal com aumento de 630x em óleo de imersão.

A translocação nuclear do NF- κ B e dos GR foi reduzida por inibidores das NOS (7-NI 200 μ M e L-NA 200 μ M) e pelo *scavenger* de NO (PTIO 100 μ M), conforme mostra a Figura 17, Painéis A e B, respectivamente.

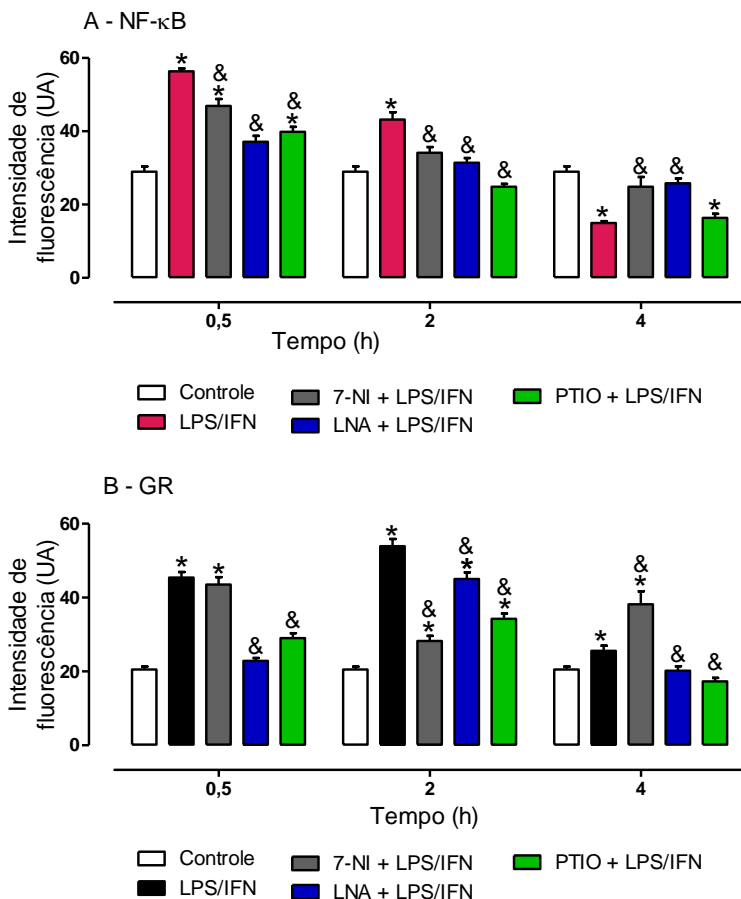


Figura 17. Efeito da inibição das NOS constitutivas e do sequestro de NO sobre a translocação nuclear do NF- κ B (Painel A) e de GR (Painel B) nas CML A7r5 avaliado por imunofluorescência. Os inibidores 7-NI (200 μ M) e L-NA (200 μ M) e o scavenger de NO, PTIO (100 μ M), foram incubados por 30 minutos antes da estimulação com LPS/IFN (LPS 1 μ g/mL e IFN 200 U/mL). As imagens foram adquiridas em microscópio de fluorescência Confocal com aumento de 630x em óleo de imersão, quantificadas com o Software LAS AF Lite® e os resultados expressos como média \pm erro padrão da média da intensidade de fluorescência (unidades arbitrárias – UA) de pelo menos 100 núcleos/experimento, de 3 experimentos diferentes. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle e & $p < 0,05$ em relação ao grupo LPS/IFN.

4.7 Imunoeletroforese (*Western blotting*): Translocação nuclear de NF- κ B e de GR, seu curso temporal e envolvimento de NO

Para confirmar e eliminar a interferência da autofluorescência dos compostos, os grupos experimentais do ensaio de imunofluorescência foram repetidos e a avaliação da translocação nuclear foi realizada por imunoeletroforese de proteínas (*Western blotting*). O perfil de translocação de GR obtido (Figura 19) foi semelhante ao perfil mostrado pela imunofluorescência. No entanto, o perfil de translocação do NF- κ B (Figura 18) foi diferente, pois teve um pico em 2 horas e os níveis de translocação 4 horas após a estimulação ainda estavam aproximadamente 30% maiores que o grupo controle.

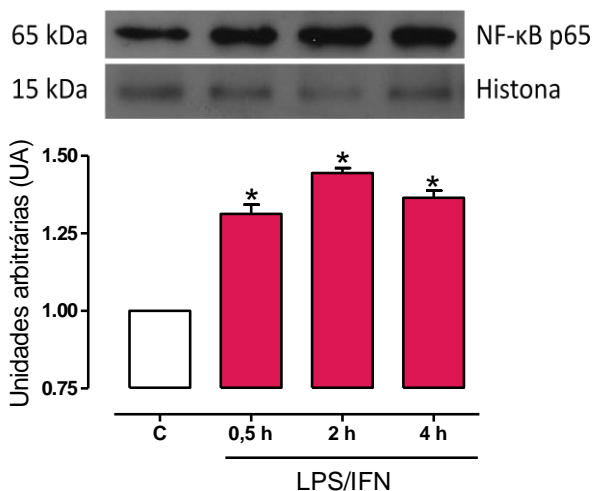


Figura 18. Curso temporal da translocação nuclear de NF- κ B avaliado por imunoeletroforese em células musculares lisas A7r5 após estimulação com LPS/IFN. O gráfico representa a quantificação por densitometria óptica da expressão de NF- κ B no núcleo de células musculares lisas A7r5 estimuladas com LPS/IFN (LPS 1 μ g/mL e IFN 200 U/mL) por 0,5, 2 e 4 horas. Os resultados estão expressos em porcentagem em relação ao grupo controle e representam a média \pm erro padrão da média de 3 experimentos. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

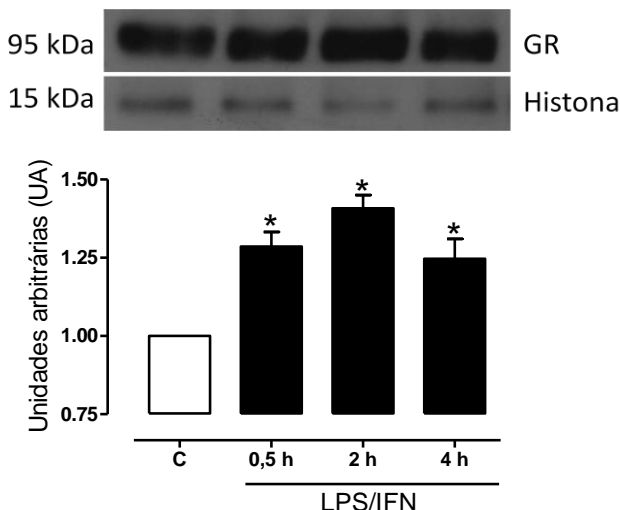
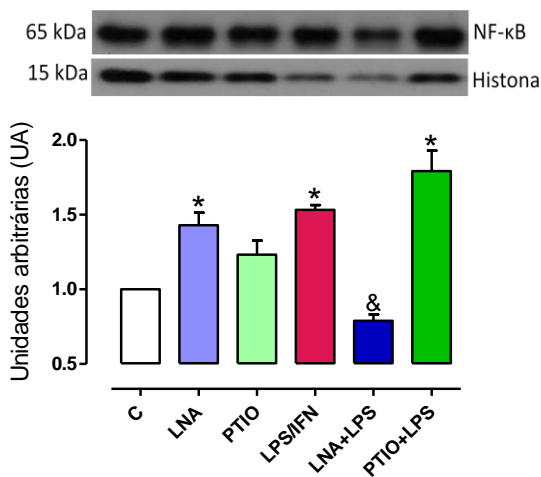


Figura 19. Curso temporal da translocação nuclear de GR avaliado por imunoeletroforese em células musculares lisas A7r5 após estimulação com LPS/IFN. O gráfico representa a quantificação por densitometria óptica da expressão de GR no núcleo de células musculares lisas A7r5 estimuladas com LPS/IFN (LPS 1 $\mu\text{g/mL}$ e IFN 200 U/mL) por 0,5, 2 e 4 horas. Os resultados estão expressos em porcentagem em relação ao grupo controle e representam a média \pm erro padrão da média de 3 experimentos. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

Confirmando os resultados obtidos com a imunofluorescência, a incubação das células com L-NA, reduziu significativamente a translocação nuclear tanto do NF- κB quanto de GR (Figura 20, Painéis A e B).

No entanto o pré-tratamento com PTIO diminuiu somente a translocação de GR, mas não do NF- κB . Embora a translocação do NF- κB não tenha sido diminuída na presença de PTIO, as células que tiveram as NOS inibidas ou o NO sequestrado pelo PTIO não foram ativadas da mesma forma que as células do grupo LPS/IFN. Isto pôde ser evidenciado pela redução substancial dos níveis de nitrito no sobrenadante das culturas ao longo de 72 horas (Figura 21).

A



B

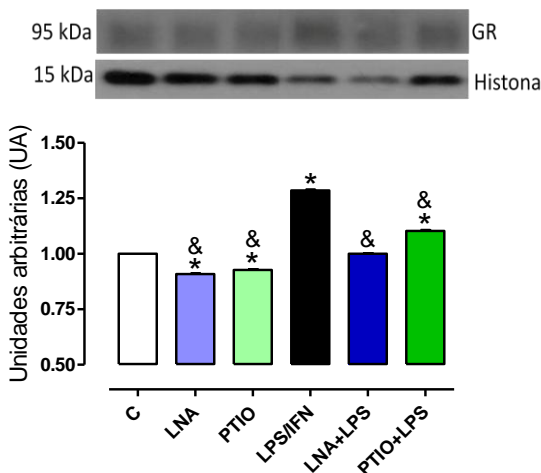


Figura 20. Efeito da inibição das NOS constitutivas e do sequestro de NO sobre a translocação nuclear de NF- κ B e GR em CML avaliado por imunoeletroforese. Os gráficos A e B representam, respectivamente, a quantificação por densitometria óptica da expressão de NF- κ B e GR no núcleo de células musculares lisas A7r5 estimuladas com LPS/IFN (LPS 1 μ g/mL e IFN 200 U/mL) por 2 horas e pré-incubadas com PBS (grupos controle, L-NA, PTIO e LPS/IFN), L-NA (200 μ M) ou PTIO (100 μ M). Os resultados estão expressos em porcentagem em relação ao grupo controle e representam a média

± erro padrão da média. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle e & $p < 0,05$ em relação ao grupo LPS/IFN.

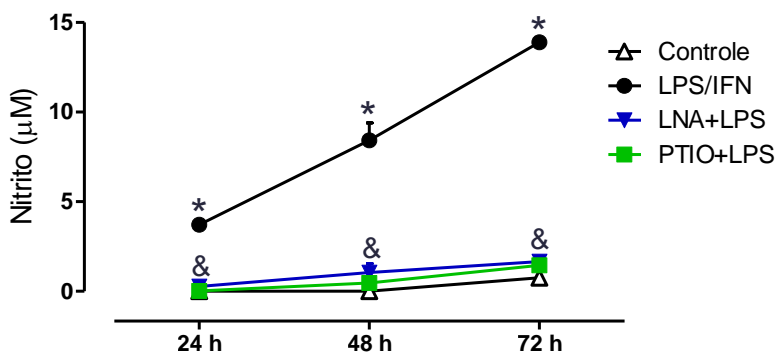
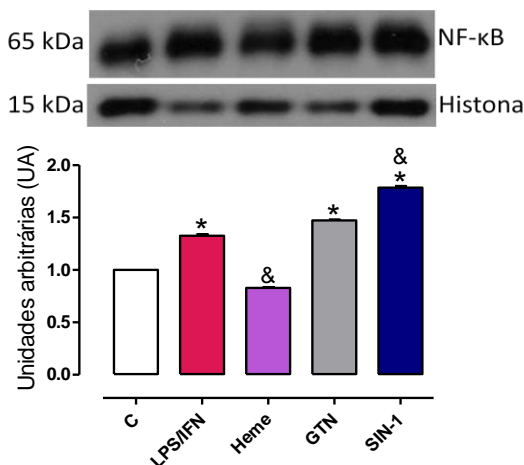


Figura 21. Curva temporal da produção de nitrito por células musculares lisas estimuladas com LPS/IFN na presença e na ausência de um inibidor não seletivo para NOS e de um *scavenger* de NO. O gráfico representa a quantificação de nitrito presente no sobrenadante da cultura nos períodos indicados. O L-NA (200 µM) e o PTIO (100 µM) foram incubados por 30 minutos antes da estimulação com LPS/IFN (LPS 1 µg/mL e IFN 200 U/mL) e mantidos até o momento da coleta do sobrenadante da cultura. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle e & $p < 0,05$ em relação ao grupo LPS/IFN.

4.8 Translocação nuclear do NF-κB e dos GR por imunoeletroforese: envolvimento de NO, EROs e peroxinitrito

Para investigar o envolvimento das EROs, do NO e do peroxinitrito (que pode estar sendo gerado pela reação do ânion superóxido com o NO) durante a ativação celular, foi utilizada a técnica de imunoeletroforese com o extrato nuclear das CML A7r5. Como mostrado na Figura 22, Painel A, a presença do doador de NO (GTN) e de peroxinitrito induziram a translocação nuclear de NF-κB de maneira mais pronunciada que o LPS/IFN, sugerindo que a translocação nuclear de NF-κB depende tanto de NO quanto de peroxinitrito. Na mesma Figura, Painel B observa-se que a presença do doador de NO induziu também a translocação nuclear de GR em magnitude menor que o LPS/IFN, enquanto o heme não induziu translocação. Surpreendentemente, a translocação nuclear induzida pelo doador de peroxinitrito foi semelhante àquela induzida pelo LPS/IFN, sugerindo que o mecanismo de translocação de GR na presença de LPS/IFN também seja dependente da formação de peroxinitrito.

A



B

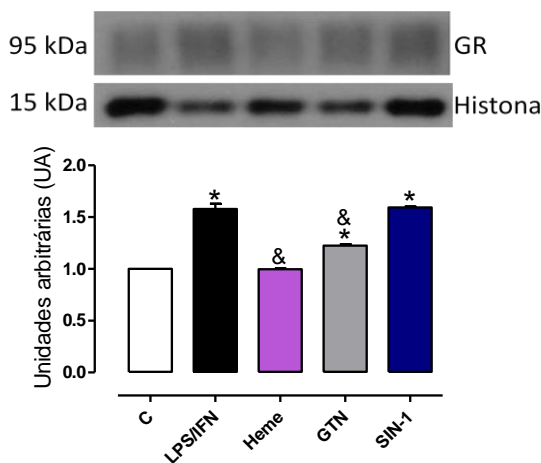


Figura 22. Efeitos do heme, GTN e SIN-1 sobre a translocação nuclear de NF-κB e GR em CML A7r5 avaliado por imunoelctroforese. Os gráficos A e B representam, respectivamente, a quantificação por densitometria óptica da expressão de NF-κB e GR no núcleo de células musculares lisas A7r5 estimuladas por 2 horas com LPS/IFN (LPS 1 µg/mL e IFN 200 U/mL), heme (10 µM), GTN (10 µM) e SIN-1 (100 µM). Os resultados estão expressos em porcentagem em relação ao grupo controle e representam a média ± erro padrão da média. *p < 0,05 em relação ao grupo controle e & p < 0,05 em relação ao grupo LPS/IFN.

5 DISCUSSÃO

Infecções por microrganismos e, conseqüentemente, a presença de endotoxinas (LPS) e citocinas, colocam o organismo em uma condição de estresse e levam a um aumento considerável na concentração de corticosteroides circulantes para controlar e iniciar o processo de resolução da resposta inflamatória (MOLIJN *et al.*, 1995). Porém, durante quadros de choque séptico, estudos mostraram que os GC endógenos não são capazes de inibir, por exemplo, a indução da NOS-2. Como inicialmente a sepse era considerada apenas uma resposta inflamatória sistêmica exacerbada, as terapias utilizadas visavam combater a resposta inflamatória através da administração de altas doses de GC sintéticos (BONE, 1996). No entanto, na maioria dos casos e em vários tipos de sepse, a utilização dos GC sintéticos não foi capaz de melhorar o quadro clínico dos pacientes (BONE, 1991; COHEN, 2002), sendo abandonados anos depois (BALK, 2003).

A ineficácia dos GC em animais endotoxêmicos foi descrita pela primeira vez em 1977 por Berry tornando-se alvo de vários estudos (BERRY, 1977). A incubação de GR com doadores de NO (os quais poderiam mimetizar o efeito do NO produzido em grandes quantidades durante o choque séptico) diminuiu a capacidade de ligação de GR de fibroblastos L929, *in vitro*. Considerando a alta afinidade do NO por sulfidrilas (-SH) em resíduos de cisteína e que o GR possui cisteínas críticas ao seu funcionamento, sugeriu-se que a falha no sistema de "freio" da resposta inflamatória poderia ser atribuída às elevadas concentrações de NO produzidas durante a sepse que nitrosilariam grupos -SH críticos à ativação e ligação dos GC aos seus receptores (GALIGNIANA, PIWIEN-PILIPUK e ASSREUY, 1999).

A confirmação da participação do NO na diminuição da capacidade de ligação de GR *in vivo*, durante a sepse, foi demonstrada pelo nosso laboratório em 2004 por DUMA e colaboradores (2004). Este trabalho mostrou uma relação de dependência entre a produção de NO e a capacidade de ligação dos GR em diferentes tecidos, uma vez que a inibição máxima da capacidade de ligação dos GR coincidiu com a máxima produção de NO em animais endotoxêmicos e animais submetidos ao modelo de sepse por ligadura e perfuração do ceco (CLP). Outras evidências da participação do NO na diminuição da capacidade de ligação dos GR também foram demonstradas nesse estudo. O tratamento dos animais com um inibidor não seletivo das NOS (L-NAME) preveniu a inibição da capacidade de ligação dos GR

causada pela injeção de LPS e a injeção prévia de um doador de NO (SNAP) impediu a ação da dexametasona em vários órgãos de animais endotoxêmicos.

Macrófagos da medula óssea de camundongos *knockout* para a enzima NOS-3 apresentaram menor atividade do NF- κ B, expressaram menos NOS-2 e, conseqüentemente, produziram menores quantidades de NO em resposta à estimulação com LPS, sugerindo a participação do NO derivado da enzima NOS-3 na iniciação da resposta inflamatória (CONNELLY *et al.*, 2003). A injeção de LPS (e.v.) em ratos induziu uma queda da pressão arterial de curta duração (2 horas) que, em vista da rapidez de instalação, foi mediada pela liberação de NO de NOS constitutivas. A supressão desta liberação inicial de NO por inibidores das NOS preveniu o desenvolvimento da resposta inflamatória sistêmica no modelo de endotoxemia avaliado 8 horas após a injeção de LPS (DUMA, 2005). Considerando que a aminoguanidina, um inibidor dito seletivo para a isoforma induzida, também inibe a enzima neuronal (ALDERTON, COOPER e KNOWLES, 2001), suspeitou-se que a enzima neuronal deveria ter papel relevante nesta liberação precoce de NO. A partir deste resultado, foi investigado o papel da NOS-1 e demonstrado pela primeira vez a participação desta enzima na queda transitória da pressão arterial que ocorre nas primeiras duas horas após a injeção de LPS em ratos. Além disso, a inibição da atividade inicial da NOS-1 com 7-nitroindazol (7-NI), um inibidor seletivo (principalmente quando usado *in vivo*) para esta isoforma, melhorou vários parâmetros inflamatórios e cardiovasculares clássicos relacionados ao desenvolvimento da síndrome séptica. A supressão da atividade da NOS-1 resultou em níveis normais da capacidade de ligação dos GR em animais submetidos ao CLP e/ou à injeção de LPS. Por fim, os resultados desse estudo sugeriram a ocorrência de um pulso inicial de NO oriundo da NOS-1 que estaria intimamente relacionado com a iniciação da resposta inflamatória *in vivo* (DUMA, 2005).

Com base nos resultados anteriores do laboratório e dos estudos publicados por CONNELLY *et al.* (2001, 2003), o objetivo inicial deste trabalho era entender os mecanismos moleculares pelos quais o NO influencia o início da resposta inflamatória durante a sepse em CML vasculares e a dinâmica dos GR neste processo. As CML vasculares estão envolvidas na manutenção do tônus vascular e influenciam enormemente a regulação da pressão sanguínea. Durante a sepse e o choque séptico, que são caracterizados pela hipotensão e hiporeatividade à vasoconstritores, as CML parecem sofrer profundas alterações na sua

fisiologia em função dos mecanismos moleculares ativados durante a inflamação sistêmica.

Dessa forma, como utilizamos CML de uma linhagem de células obtidas de aortas torácicas de embriões de ratos (A7r5) a primeira parte deste trabalho foi voltada para o estudo da similaridade de determinados sistemas entre a linhagem e células de músculo liso vascular. Estes sistemas são a capacidade de indução da NOS-2 e produção de NO e a existência e funcionalidade de GR. De acordo com a revisão escrita por GINNAN *et al.* (2008), a enzima NOS-2 de CML de ratos necessita da ocupação de pelo menos 60% da sua região promotora para obter a máxima ativação da enzima, como ocorre em resposta ao conjunto de estímulos: LPS, IFN- γ , TNF- α e IL-1 β (também chamado de *Cytomix*). Por isso e pelo fato destas células não serem ativadas apenas com LPS (dados não mostrados), optamos por utilizar a combinação de LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) e IFN- γ (200 U/mL) que se mostrou eficaz na ativação das CML A7r5.

A ativação das células, que neste caso refere-se à indução da expressão e atividade da NOS-2, foi mensurada através da produção de nitrito, um metabólito do NO. Observamos que a produção de NO nas CML A7r5 aumenta de forma tempo-dependente e necessita da presença contínua do estímulo, diferentemente de macrófagos. Em macrófagos, células especializadas no combate a microrganismos, a retirada do estímulo após 2 horas de incubação não afeta o perfil de ativação celular (ASSREUY, CUNHA, LIEW e MONCADA, dados não publicados).

A expressão da enzima NOS-2 (como, aliás, de várias proteínas pró-inflamatórias) é dependente da ativação do NF- κ B, cuja atividade é influenciada por diversos fatores. Muitos estudos mostram que a produção de EROs é capaz de ativar o NF- κ B (para revisão ver GLOIRE, LEGRAND-POELS e PIETTE, 2006). A produção de EROs em CML em condições de inflamação e doenças como arteriosclerose também já foi amplamente descrita. Na revisão feita por LAMBETH (2004) sobre as enzimas NADPH oxidases é descrito que a atividade da enzima NOX-1 (pertencente à família das NADPH oxidases) é induzida em CML pelo IFN, resultando no aumento da produção de EROs. As CML A7r5 estimuladas com LPS ou com heme também aumentaram a produção de EROs em 2 e 4 horas de incubação. Um achado interessante neste experimento foi que a incubação das células com doadores de NO na concentração de 1 μM juntamente com o LPS, causou uma aparente diminuição na produção de EROs. Uma possível explicação para este fato é que tenha ocorrido a formação de peroxinitrito (formado pela reação do NO com ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$))

quando quantidades estequiométricas destas espécies são geradas), o qual tem pouca afinidade pela sonda DHR 123. Esta sonda reconhece principalmente o peróxido de hidrogênio.

Outros mecanismos que exercem forte regulação da atividade do NF- κ B envolvem a participação de GR. Na maior parte das respostas inflamatórias os GC, tanto endógenos quanto exógenos, são capazes de limitar o processo inflamatório e contribuir para a resolução da inflamação. As CML A7r5 não são exceção a esta regra. A incubação das células com um agonista dos GR horas antes da estimulação com LPS/IFN suprimiu a resposta de ativação celular, medida como formação de nitrito no meio de cultura. O fato de um antagonista competitivo dos GR, RU-486, ter revertido à ação inibitória da dexametasona em células estimuladas com LPS/IFN não só confirma a existência e funcionalidade dos GR, como indica que eles devem estar com sua estrutura normal, apesar de estarem presentes em uma linhagem de células.

No trabalho de DUMA (2005), já mencionado, a existência de um pulso precoce de NO foi sugerido pela hipotensão que se seguia à injeção de LPS. Com o uso de uma sonda fluorescente para NO, demonstramos pela primeira vez que o pulso inicial de NO ocorre de fato e, mais ainda, que o músculo liso vascular pode ser uma importante fonte deste pulso. A estimulação das células com LPS/IFN elevou os níveis de NO intracelulares rapidamente. Dado o curto espaço de tempo entre o estímulo e a liberação de NO (segundos), à presença das duas isoformas constitutivas de NOS nestas células e a diminuta quantidade de NO liberada, só detectada por uma sonda fluorescente com alta sensibilidade, sugerimos que o pulso de NO observado deve ser oriundo da atividade de uma NOS constitutiva.

A parte inicial deste trabalho consistiu em uma etapa de validação da existência e funcionalidade dos atores que nos interessavam para podermos passar à fase seguinte. Confirmada a presença das enzimas constitutivas (NOS-1 e NOS-3), a capacidade de indução da NOS-2 com o estímulo LPS/IFN e a presença e funcionalidade de GR, demos início à segunda parte do trabalho referente à investigação dos mecanismos moleculares pelos quais o NO influencia o início da resposta inflamatória durante a sepse em CML vasculares e a dinâmica dos GR neste processo.

O pulso inicial de NO desempenha uma função importante no processo de ativação celular da musculatura lisa vascular. Esta conclusão foi substantiada pelo fato de que a incubação prévia das células com inibidores não seletivos das NOS e com um sequestrador

(*scavenger*) de NO, o PTIO, diminuiu o pulso inicial de NO e impediu significativamente a ativação celular. Com base nestes resultados e com dados da literatura, levantamos a hipótese de que o pulso de NO seria responsável pela desestabilização do complexo NF- κ B/GR, possibilitando a translocação nuclear e ativação do NF- κ B e mantendo os GR inativos no citosol. Outra possibilidade seria a de que o NO promoveria a degradação do I κ B, o que também induziria a translocação nuclear e ativação do NF- κ B, culminando na ativação celular.

Ao acompanhar a dinâmica do NF- κ B e dos GR nas CML através da técnica de imunofluorescência observamos que estas células possuem uma quantidade basal de NF- κ B e de GR no núcleo. Os níveis basais de NF- κ B no núcleo são maiores que os níveis de GR, podendo este resultado ser explicado pela atividade basal do NF- κ B em CML (SHIN *et al.*, 1996). Todavia, nos causou surpresa o fato de haver uma quantidade apreciável de GR no núcleo, já que o paradigma atual é que estes receptores translocam para o núcleo quando ligados aos seus agonistas.

Como era esperado, devido às evidências funcionais da atividade do NF- κ B obtidas anteriormente, a estimulação com LPS/IFN causou a rápida translocação do NF- κ B para o núcleo das CML A7r5. Esta translocação tem um pico ao redor de duas horas após o estímulo, retornando aos níveis basais 4 horas após a estimulação. A nossa grande surpresa ocorreu com a constatação de que a estimulação com LPS/IFN promoveu também a translocação nuclear de GR. Essa translocação ocorreu de forma tempo-dependente e na ausência de ligantes exógenos, já que os únicos ligantes presentes eram oriundos do soro utilizado para suplementar o meio de cultura.

Demonstramos pelas técnicas de imunofluorescência e imunoeletroforese que a translocação destes elementos para o núcleo das CML está relacionado com o pulso inicial de NO, uma vez que a intervenção farmacológica na produção inicial de NO causou uma diminuição da translocação nuclear tanto de NF- κ B quanto de GR. O bloqueio prévio da geração do pulso de NO com L-NA diminuiu significativamente os níveis de translocação, sugerindo que uma ou as duas enzimas NOS constitutivas presentes nestas células geram o pulso de NO. É fundamental chamar a atenção que a supressão deste pulso inicial não só teve efeito sobre a translocação nuclear de NF- κ B e de GR, como também reduziu substancialmente a ativação celular, evidenciada pela diminuição da produção de NO e dos níveis de nitrito dosados no sobrenadante da cultura. Esta coincidência de eventos é sugestiva que a translocação nuclear de NF- κ B (já sabido) e de GR

(novidade deste trabalho) guardam relação com a posterior indução de NOS-2 (e de outras proteínas pró-inflamatórias).

Outro aspecto que merece ser mencionado é que nos grupos que receberam apenas os inibidores de NOS e o PTIO houve um aumento significativo nos níveis de translocação nuclear do NF- κ B, apesar de não haver indicativo de ativação celular (não houve alteração nos níveis de nítrito destes grupos em relação ao grupo controle). Conforme o trabalho de TOGASHI e colaboradores (1997), que mostrou que as quantidades de NO basais produzidas por astrócitos desempenham a função de manter o NF- κ B inativo no citoplasma, sugerimos que o aumento da translocação nuclear de NF- κ B nos grupos tratados apenas com inibidores seja decorrente de um mecanismo similar ao descrito por TOGASHI *et al.* (1997). Entretanto, apenas a inibição da atividade do NO basal não é suficiente para causar a ativação celular, a qual certamente depende de uma combinação de fatores.

Em função de alguns compostos serem autofluorescentes, como é o caso do PTIO, foi necessária a utilização da técnica de imunoeletroforese para confirmar os dados obtidos com a imunofluorescência. Entretanto, os resultados para os mesmos tratamentos nas técnicas de imunofluorescência e imunoeletroforese apresentaram algumas diferenças. A principal diferença foi no perfil de translocação nuclear do NF- κ B ao longo de 4 horas, onde o resultado obtido por imunofluorescência mostrou um pico de translocação em 30 minutos e um subsequente decréscimo até retorno aos níveis basais 4 horas após a estimulação. Já na imunoeletroforese, o pico de translocação pareceu ocorrer 2 horas após a estimulação e permaneceu elevado até 4 horas após o estímulo. Contudo, ao comparar o nível de translocação entre as duas técnicas no grupo LPS/IFN de 2 horas observou-se que os valores de porcentagem em relação ao grupo controle são idênticos, o que sugere que as divergências vistas nos tempos de 30 minutos e 4 horas decorram em função da técnica de imunoeletroforese. Outro indício que sustenta esta hipótese é que o perfil de translocação nuclear obtido para os GR foi semelhante entre as duas técnicas, havendo somente um valor percentual da quantificação de fluorescência maior quando comparado aos valores percentuais da densitometria das bandas. Com base nestes resultados sugerimos que, embora ambas as técnicas sejam apenas semi-quantitativas, a técnica de imunofluorescência tende a ser mais fidedigna à realidade, uma vez que as células são mantidas íntegras, rapidamente fixadas e os procedimentos são de fácil execução. Já a imunoeletroforese oferece

mais dificuldades técnicas, tanto durante o procedimento de obtenção da amostra, como na execução da técnica em si.

A indução da expressão da enzima NOS-2 depende majoritariamente da atividade do NF- κ B. Para tornar o NF- κ B ativo é necessário que ele seja translocado para o núcleo celular onde ele se liga a sítios específicos do DNA e inicia a transcrição de inúmeros genes pró-inflamatórios. Ao verificarmos que o LPS/IFN era capaz de induzir também a translocação nuclear dos GR, os quais possuem importante efeito inibitório da atividade do NF- κ B, esperávamos que uma vez no núcleo, estes receptores fossem capazes de impedir a atividade do NF- κ B e impedir a ativação celular gerada pelo estímulo.

Mostramos que a translocação nuclear de GR e NF- κ B pode ser induzida por um doador de NO, o GTN na concentração de 10 μ M. Este resultado sugere que o NO também possa exercer um efeito dual sobre o NF- κ B em CML, como foi mostrado por CONNELLY e colaboradores (2001) em macrófagos. No entanto, esse aumento na translocação do NF- κ B não significa necessariamente que uma resposta de ativação celular será desencadeada, uma vez que os GR também são translocados para o núcleo e provavelmente estão ativos, já que as concentrações de NO ainda são relativamente baixas. Um aspecto importante é que a incubação das células com heme na concentração de 10 μ M, elevou os níveis de EROs intracelulares em 2 e 4 horas, mas não foi capaz de induzir a translocação de GR e de NF- κ B. Contudo, ao incubar as CML com um doador de peroxinitrito, que é formado na célula pela reação do ânion superóxido (uma ERO gerada rapidamente pelas CML em resposta ao LPS) com o NO (para o qual foi demonstrado haver um pulso logo após a estimulação com LPS/IFN), os níveis de translocação de ambos os fatores foram significativamente aumentados. A incubação com peroxinitrito, o qual é muito reativo, pode afetar a atividade dos GR α , tanto pela nitração do receptor no citoplasma quanto pela inibição da atividade de um importante cofator dos GR no núcleo, a histona desacetilase (HDAC).

Em função dos resultados obtidos, a hipótese inicial de que o início da ativação celular ocorria devido à desestabilização da ligação do complexo NF- κ B/GR por um pulso de NO e culminaria na translocação nuclear do NF- κ B e manutenção dos GR no citoplasma teve que ser reformulada.

Durante respostas inflamatórias agudas *in vivo*, os estímulos causadores da inflamação ativam simultaneamente o eixo HPA, com consequente aumento na produção e liberação de GC na corrente sanguínea. Estes GC ativam então os GR α . Como a liberação de NO

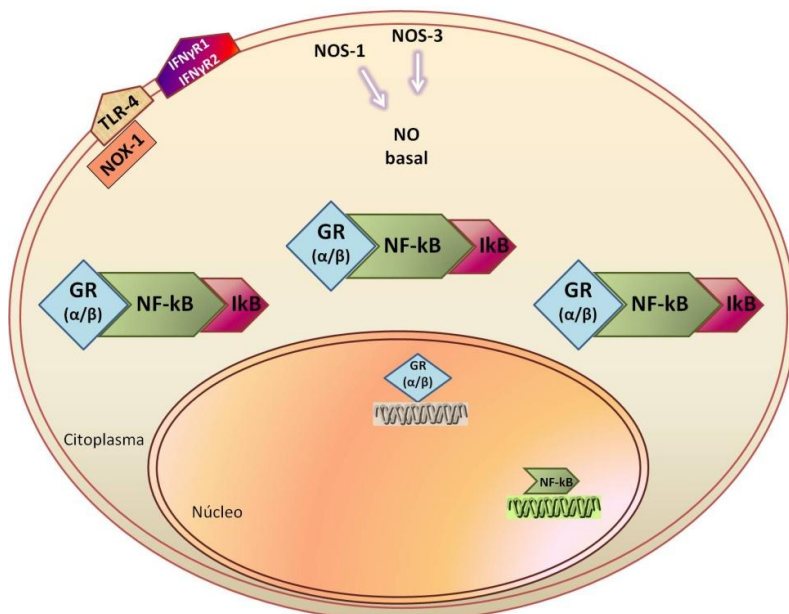
ocorre instantes após a estimulação, o pulso de NO estimularia a translocação do NF- κ B dando início à ativação celular. Simultaneamente, o NO e o peroxinitrito (gerado pela simultaneidade da formação de NO e ânion superóxido) poderiam nitrosilar e nitrar parte dos GR α no citoplasma e promover a sua translocação em uma conformação inativa. Poucos minutos depois destes eventos, os GC liberados na corrente sanguínea atravessariam a membrana plasmática ativando ações não-genômicas através dos receptores de GC de membrana (GRm) e seriam reconhecidos pelos GR α que não foram afetados pelo NO e pelo peroxinitrito, dando início à inibição da ativação celular ou de uma resposta anti-inflamatória (*in vivo*).

Contudo, durante inflamações crônicas e/ou sistêmicas os estímulos inflamatórios são mantidos constantemente no organismo e afetam todos os tecidos do corpo, exacerbando a resposta inflamatória. Diversos estudos mostraram que a resistência à ação dos GC é um problema comum encontrado no tratamento destas doenças (ITO *et al.*, 2004; BARNES, 2006). VENKATARAMAN e colaboradores (2007) observaram que a razão intracelular entre GR α e GR β influencia a sensibilidade aos GC e ocorre de maneira diferente em diversos tecidos. DUMA (2005) mostrou que os GR dos pulmões são mais sensíveis à inativação pela S-nitrosilação provocada pelo NO em fases tardias da sepse. De acordo com este dado, SMOAK e CIDLOWSKI (2004) demonstraram que o aumento do número de GR β presente nos pulmões está envolvido na resistência aos GC na doença obstrutiva pulmonar crônica. Outros três mecanismos foram atribuídos à causa da resistência aos GC em doenças crônicas, como asma, doença obstrutiva pulmonar crônica e artirte reumatóide. São eles i) ativação da via MAP quinase p38 que leva à fosforilação dos GR diminuindo sua afinidade pelos GC; ii) falha na inibição dos fatores de transcrição pelo mecanismo de interação proteína-proteína e iii) mecanismo de falha da indução de cofatores essenciais para a atividade dos GR, como a HDAC-2, em função do estresse oxidativo e, principalmente, pela ação do peroxinitrito sobre a HDAC-2 (BARNES, 2006; MARWICK *et al.*, 2009).

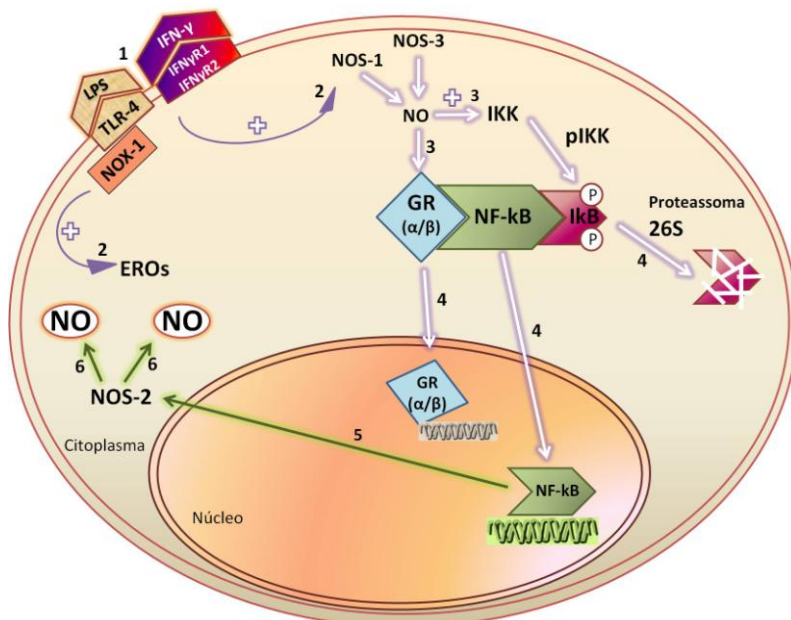
Com base no que foi exposto acima e pela indução da translocação nuclear de GR pelo doador de peroxinitrito observada no presente trabalho, podemos sugerir que nos casos de sepse praticamente todos os tecidos sofreriam os eventos descritos para as CML e que a formação de peroxinitrito e a inativação dos GR ocorreria em larga escala, uma vez que o estímulo é sistêmico e constante. A ocorrência simultânea destes eventos e produção de NO, EROs, peroxinitrito e ativação do NF- κ B em

milhares de células adjacentes possibilitaria a ação parácrina destas espécies e contribuiria para a inativação de um número crescente de GR α , elevação da expressão de GR β e inativação da HDAC-2, culminando na resistência à ação dos GC durante a sepse. Esta hipótese sustentaria o fato de que a inibição inicial da produção de NO melhorou os parâmetros inflamatórios da sepse, impediu a diminuição da capacidade de ligação dos GR e aumentou a sobrevida dos animais (DUMA, 2005), decorrentes da inibição do pulso inicial de NO. Esta diminuição limitaria esta cascata de reações, diminuindo a intensidade da resposta inflamatória como um todo. O trabalho de TORRES-DUEÑAS e colaboradores (2007) também demonstrou a importância da inibição da produção inicial de peroxinitrito na sepse, uma vez que a inibição desta espécie restabeleceu a migração de neutrófilos e aumentou a sobrevida de animais sépticos.

Nossos resultados, portanto permitem a montagem de uma hipótese de trabalho para o desenvolvimento de futuras etapas deste projeto. A sequência de eventos estão nos esquemas a seguir:



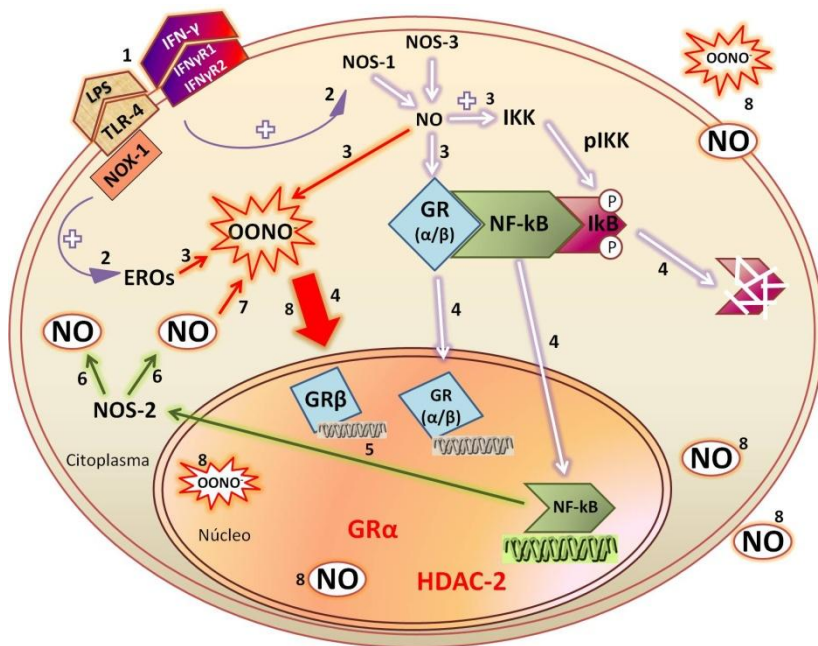
Esquema 1. Célula muscular lisa em repouso. A atividade basal das NOS constitutivas de células musculares lisas produziria baixas concentrações de NO, o qual atuaria mantendo o complexo NF-κB/GR no citoplasma.



Esquema 2. Mecanismos da ativação celular das CML. A estimulação das CML com LPS/IFN ocorre através da ativação dos receptores *Toll-like* (TLR-4) e dos receptores de IFN- γ (JAK/STAT) (1) e leva a um aumento na produção de EROs, principalmente pela enzima NADPH oxidase 1 (NOX-1), e também induz um pulso inicial de NO (2). O pulso de NO por si só causaria a desestabilização do complexo NF- κ B/GR através da indução da fosforilação do I κ B (3) e estimularia a translocação nuclear maciça do NF- κ B. Também induz a translocação nuclear de GR (α e/ou β) por um mecanismo ainda desconhecido. Ao mesmo tempo o I κ B é degradado pelo proteassoma 26S (4). A translocação de NF- κ B inicia a transcrição de genes pró-inflamatórios como o da NOS-2 (5). A NOS-2 ativa produz grandes quantidades de NO (6). IKK: complexo de quinases de I κ B; pIKK: IKK fosforilada.

Os Esquemas 1, 2 e 3 ilustram o possível mecanismo pelo qual o NO e o peroxinitrito influenciam a translocação nuclear de NF- κ B e GR após estimulação com LPS/IFN em CML. No estado de repouso o NO basal produzido pelas NOS constitutivas atuaria mantendo o complexo NF- κ B/GR no citoplasma (Esquema 1). Ao estimular as células com LPS/IFN, ocorreria um aumento na produção de EROs, principalmente

pela enzima NOX-1. Somente as EROs formadas não são capazes de ativar as CML, necessitando de um pulso de NO oriundo da atividade das enzimas NOS-1 e/ou NOS-3 para ocorrer à ativação celular. O pulso de NO por si só causaria a desestabilização do complexo NF- κ B/GR através da indução da fosforilação do I κ B e estimularia a translocação nuclear maciça de NF- κ B (Esquema 2). O pulso de NO também ativaria a translocação nuclear de GR (α e/ou β) por um mecanismo ainda desconhecido. A formação de peroxinitrito, pela reação do ânion superóxido com o NO, potencializaria a translocação nuclear de NF- κ B e de GR (α e/ou β), induziria o aumento de GR β , inativaria os GR α e impediria a atividade da HDAC-2 no núcleo (Esquema 3).



Esquema 3. Mecanismos da ativação celular das CML e do envolvimento do NO e peroxinitrito neste processo. A estimulação das CML com LPS/IFN ocorre através da ativação dos receptores *Toll-like* (TLR-4) e dos receptores de IFN- γ (JAK/STAT) (1) e leva a um aumento na produção de EROs, principalmente pela enzima NADPH oxidase 1 (NOX-1), e também induz um pulso inicial de NO (2). O pulso de NO por si só causaria a desestabilização do complexo NF- κ B/GR através da indução da fosforilação do I κ B. A reação do NO com o ânion superóxido que estaria sendo gerado como uma das EROs

poderia formar peroxinitrito (OONO^\cdot) (3). O pulso de NO estimularia a translocação nuclear maciça do NF- κ B. Também induziria a translocação nuclear de GR (α e/ou β) por um mecanismo ainda desconhecido. O peroxinitrito recém formado iniciaria a nitração de resíduos de tirosina, diminuindo a atividade do GR α e da enzima desacetilase-2 (HDCA-2). Neste momento também o I κ B seria degradado pelo proteassoma 26S. (4). A translocação de NF- κ B inicia a transcrição de genes pró-inflamatórios como o da NOS-2 (5). A NOS-2 ativa produz grandes quantidades de NO (6). As quantidades elevadas de NO produzidas pela NOS-2 contribuiriam para a formação de quantidades maiores de peroxinitrito (7). Uma maior quantidade de peroxinitrito potencializaria a translocação nuclear de NF- κ B e de GR (α e/ou β), induziria o aumento de GR β , inativaria os GR α e impediria a atividade da HDAC-2 no núcleo. O NO e peroxinitrito oriundos das células adjacentes contribuiriam para a diminuição da capacidade de ligação do GR de um número crescente de receptores e contribuiria para a resistência aos GC durante a sepse (8).

Algumas questões ainda precisam ser respondidas para que possamos ter um quadro mais detalhado e confirmar ou reformular a nossa hipótese de trabalho. Algumas destas questões são:

- a) Por qual razão um receptor (GR) que inibe a atividade de NF- κ B é translocado com cinética e compartimentalização muito parecidas com as do fator de transcrição?;
- b) A translocação de GR é causa, consequência ou um epifenômeno da ativação celular?
- c) O GR translocado está ativo ou não?
- d) Por que, apesar da translocação do GR, o processo de ativação celular ocorre, sendo este receptor um inibidor de NF- κ B?
- e) Numa situação *in vivo*, também ocorre a translocação de GR quando na vigência de um estímulo inflamatório?
- f) Qual a relevância disso para a iniciação/resolução/perpetuação de uma resposta inflamatória?
- g) Qual o real papel das EROs e de NO nestes fenômenos?
- h) Qual a influência da ativação celular sobre HDAC-2?

A continuidade deste projeto e as respostas às questões levantadas permitirão uma melhor compreensão dos aspectos moleculares da iniciação de uma resposta inflamatória *in vivo* e dos mecanismos que levam à ineficácia dos GC em determinadas doenças, e talvez, mostrar a existência de novos alvos terapêuticos passíveis de intervenção farmacológica.

6 CONCLUSÕES

Concluiu-se neste trabalho que células musculares lisas da linhagem A7r5 desafiadas com LPS/IFN respondem rapidamente ao estímulo gerando um pulso de NO e um aumento na produção de EROs, que por sua vez, podem gerar a produção de peroxinitrito. Foi possível concluir ainda, que estes eventos iniciais que sucedem a estimulação com LPS/IFN, inclusive a formação de peroxinitrito, são fundamentais para a ativação celular e que os mesmos exercem um importante papel na regulação da translocação nuclear de NF- κ B e de GR.

REFERÊNCIAS

ADCOCK, I. M. Molecular mechanisms of glucocorticosteroid actions. **Pulm Pharmacol**, v. 13, p. 115-126. 2000.

ALDERTON, W. K.; COOPER, C. E.; KNOWLES, R. G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **Biochem J**, v. 357, p. 593-615. 2001.

ALMAWI, W.; MELEMEDJIAN, O. Molecular mechanism of glucocorticoid antiproliferative effects: antagonism of transcription factor activity by glucocorticoid receptor. **J Leukoc Biol**, v. 71, p. 9-15. 2002.

ASEHNOUNE, K.; STRASSHEIM, D.; MITRA, S.; KIM, J. Y.; ABRAHAM, E. Involvement of reactive oxygen species in Toll-like receptor 4-dependent activation of NF-kappa B. **J Immunol**, v. 172, p. 2522-2529. 2004.

ASSREUY, J. Nitric oxide and cardiovascular dysfunction in sepsis. **Endocr Metab Immune Disord Drug Targets**, v. 6, p. 165-173. 2006.

ASSREUY, J.; CUNHA, F. Q.; LIEW, F. Y.; MONCADA, S. Feedback inhibition of nitric oxide synthase activity by nitric oxide. **Br J Pharmacol**, v. 108, p. 833-837. 1993.

BAEUEERLE, P. A. I κ B-NF-kB structures: at the interface of inflammation control. **Cell**, v. 95, p. 729-731. 1998.

BALK, R. A. Steroids in septic shock. Back from the death? **Chest**, p. 490S-499S. 2003.

BARNES, P. How corticosteroids control inflammation: quintiles prize lecture. **Br J Pharmacol**, v. 148, p. 245-254. 2006.

BECKMAN, J. S.; KOPPENOL, W. H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. **Am J Physiol**, v. 271, p. 1424-1427. 1996.

BERRY, L. J. Bacterial toxins. **Crit Ver Toxicol**, v. 5, p. 239-318. 1977.

BOLOTINA, V.M.; NAJIBI, S.; PALACINO, J.J.; PAGANO, P.J.; COHEN, R.A. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. **Nature**, v. 368, p. 850-853. 1994.

BONE, R. Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS. **Crit. Care Med**, v. 24, p. 1125-1128. 1996.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-254. 1976.

CAMPBELL, J. H.; CAMPBELL, G. R. Culture techniques and their applications to studies of vascular smooth muscle. **Clin Sci**, v. 85, p. 501-513. 1993.

CIRINO, C.; FIORUCCI, S.; SESSA, W. C. Endothelial nitric oxide synthase: the cinderella of inflammation? **Trends Pharmacol Sci**, v. 24, p. 91-95. 2003.

COHEN, J. The immunopathogenesis of sepsis. **Nature**, v. 420, p. 885-891. 2002.

CONE, J. B. Inflammation. **Am. J. Surgery**, v. 182, p. 558-562. 2001.

CONNELLY, L.; JACOBS, A. T.; PALACIOS-CALLENDER, M.; MONCADA, S.; HOBBS, A. J. Macrophage endothelial nitric-oxide synthase autoregulates cellular activation and pro-inflammatory protein expression. **J Biol Chem**, v. 278, p. 26480-26487. Jul. 2003.

CONNELLY, L.; PALACIOS-CALLENDER, M.; AMEIXA, C.; MONCADA, S.; HOBBS, A. J. Biphasic Regulation of NF-kappaB Activity Underlies the Pro-and Anti-Inflammatory Actions of Nitric Oxide. **J Immunol**, v. 166, p. 3873-3881. 2001.

CRANSHAW, J. H.; GRIFFITHS, M. J. D. Inflammatory process in the acute respiratory distress syndrome. **Curr Anaesth Crit Care**, v. 14, p. 66-73. 2003.

DAVIES, M. G.; HAGEN, P. O. Systemic inflammatory response syndrome. **Br Surg**, v. 27, p. 920-935. 1997.

DE BOSSCHER, K.; HAEGEMAN, G. Minireview: Latest perspectives on antiinflammatory actions of glucocorticoids. **Mol Endocrinol**, v. 23, p. 281-291. 2009.

DUMA, D. **Óxido nítrico e glicocorticóides: interação na sepse e na inflamação.** (Tese de doutorado em Farmacologia. Centro de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Santa Catarina). Florianópolis. 2005.

DUMA, D.; SILVA-SANTOS, J. E.; ASSREUY, J. Inhibition of glucocorticoid receptor binding by nitric oxide in endotoxemic rats. **Crit Care Med**, v. 32, p. 2304-2310. 2004.

FEELISCH, M.; NOACK, E. A. Correlation between nitric oxide formation during degradation of organic nitrates and activation of guanylate cyclase. **Eur J Pharmacol**, v. 139, p. 19-30. 1987.

FERNANDES, D. **Dinâmica da guanilato ciclase solúvel na sepse: Uma janela de oportunidade.** (Tese de Doutorado em Farmacologia. Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina). Florianópolis, p. 5. 2006.

FOSTER, M. W.; HESS, D. T.; STAMLER, J. S. Protein S-nitrosylation in health and disease: a current perspective. **Trends Mol Med**, v. 15, p. 391-404. 2009.

FRANGOIANNIS, N. G.; SMITH, C. W.; ENTMAN, M. L. The inflammatory response in myocardial infarction. **Cardiovasc Res**, v. 53, p. 31-47. 2002.

GALIGNIANA, M. D.; PIWIEN-PILIPUK, G.; ASSREUY, J. Inhibition of glucocorticoid receptor binding by nitric oxide. **Mol Pharmacol**, v. 55, p. 317-323. 1999.

GENG, Y.; HANSSON, G. K.; HOLME, E. Interferon-gamma and tumor necrosis factor synergise to induce nitric oxide production and inhibit mitochondrial respiration in vascular smooth muscle cells. **Circulation Res**, v. 71, p. 1268-1276. 1992.

GINNAN, R.; GUIKEMA, B. J.; HALLIGAN, K. E.; SINGER, H.A.; JOURD'HEUIL, D.. Regulation of smooth muscle by inducible nitric

oxide synthase and NADPH oxidase in vascular proliferative diseases. **Free Rad Biol Med**, v. 44, p. 1232–1245. 2008.

GLOIRE, G.; LEGRAND-POLES, S.; PIETTE, J. NF- κ B activation by reactive oxygen species: fifteen years later. **Biochem Pharmacol**, v. 72, p. 1493-1505. 2006.

GOLDSTEIN, S.; RUSSO, A.; SAMUNI, A. Reactions of PTIO and Carboxy-PTIO with NO, NO₂, and O₂. **J Biol Chem**, v. 278, p. 50949–50955. 2003.

GOUGT, D. J.; LEVY, D. E.; JOHNSTONE, R. W.; CLARKE, C. J. IFN- γ signaling - does it mean JAK-STAT? **Cytokine Growth Fac**, v. 19, p. 383-394. 2008.

GRAÇA-SOUZA, A. V.; ARRUDA, M. A. B.; FREITAS, M. S.; BARJA-FIDALGO, C.; OLIVEIRA, P. L.. Neutrophil activation by heme: implications for inflammatory processes. **Blood**, v. 99, p. 4160-4165. 2002.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 82-88. 2002.

HARHAJ, E. W.; DIXIT, V. M. Deubiquitinases in the regulation of NF- κ B signaling. **Cell Res**, v. 21, p. 22-39. 2011.

HART, L.; LIM, S.; ADCOCK, I.; BARNES, P. J.; CHUNG, K. F. Effects of inhaled corticosteroid therapy on expression and DNA-binding activity of nuclear factor kappaB in asthma. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 161, p. 224-231. 2000.

HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. NF- κ B in immunobiology. **Cell Res**, p. doi:10.1038/cr.2011.13. 2011.

HERSH, D.; WEISS, J.; ZYCHLINSKY, A. How bacteria initiate inflammation: aspects of the emerging story. **Curr Opin Microbiol**, v. 1, p. 43-48. 1998.

HESS, D.T.; MATSUMOTO, A.; KIM, S.O.; MARSHALL, H.E.; STAMLER, J.S. Protein S-nitrosylation: purview and parameters. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 6, p. 150-166. 2005.

INVITROGEN. [www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook/Probes-for-Reactive-Oxygen-Species-Including-Nitric-Oxide/Probes-for-Nitric-Oxide-Research.html). **Molecular Probes - The Handbook**, 2001. Disponível em: <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook/Probes-for-Reactive-Oxygen-Species-Including-Nitric-Oxide/Probes-for-Nitric-Oxide-Research.html>. Acesso em: 2 Set 2010.

ISMAELI, N.; GARABEDIANN, M. J. Modulation of glucocorticoid receptor function via phosphorylation. **Ann NY Acad Sci**, v. 1024, p. 86-101. 2004.

ITO, K.; HANAZAWA, K.; TOMITA, K.; BARNES, P. J.; ADCOCK, I. M. Oxidative stress reduces histone deacetylase 2 activity and enhances IL-8 gene expression: role of tyrosine nitration. **Biochem Bioph Res Comm**, v. 315, p. 240-245. 2004.

JEON, K.; JEONG, J.; JUE, D. Thiol-reactive metal compounds inhibit NF- κ B activation by blocking I κ B kinase. **J Immunol**, v. 22, p. 5981-5989. 2000.

KABE, Y.; ANDO, K.; HIRAO, S.; YOSHIDA, M.; HANDA, H. Redox regulation of NF- κ B activation: distinct redox regulation between the cytoplasm and the nucleus. **Antioxid Redox Signal**, v. 7, p. 395-403. 2005.

KARIN, M.; DELHASE, M. The I κ B kinase (IKK) and NF- κ B: key elements of proinflammatory signalling. **Semin Immunology**, v. 12, p. 85-98. 2000.

KELLEHER, Z. T.; MATSUMOTO, A.; STAMLER, J. S.; MARSHALL, H. E. NOS2 regulation of NF- κ B by S-nitrosylation of p65. **J Biol Chem**, v. 282, p. 30667-30672. 2007.

KOJIMA, H.; URANO, Y.; KIKUCHI, K.; HIGUCHI, T.; HIRATA, Y.; NAGANO, T. Fluorescent indicators for Imaging Nitric Oxide. **Angew Chem Int Ed**, v. 38, p. 3209-3212. 1999.

LAMBETH, D. J. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. **Nat Rev Immunol**, v. 4, p. 181-189. 2004.

LEVRAND, S.; PESSE, B.; FEIHL, F.; WAEBER, B.; PACHER, P.; ROLLI, J.; SCHALLER, M. D.; LIAUDET, L. Peroxynitrite is a potent

inhibitor of NF-kappaB activation triggered by inflammatory stimuli in cardiac and endothelial cell lines. **J Biol Chem**, v. 280, p. 34878–34887. 2005.

LEY, K. Integratiom of inflammatory signals by rooling neutrophils. **Immunol Rev**, v. 186, p. 8-18. 2002.

LI, H.; POULOS, T. L. Structure-funcion studies on nitric oxide synthases. **J Inorg Biochem**, v. 99, p. 293-305. 2005.

LIAUDET, L.; VASSALLI, G.; PACHER, P. Role of peroxynitrite in the redox regulation of cell signal transduciton pathways. **Front Biosci**, v. 14, p. 4809-4814. 2009.

LIMBOURG, F. P.; LIAO, J. K. Nontranscriptional actions of the glucocorticoid receptor. **J Mol Med**, v. 81, p. 168-174. 2003.

LIU, S.; CHEN, Z. Expanding role of ubiquitination in NF-kB signaling. **Cell Res**, v. 21, p. 6-21. 2011.

LOSCALZO, J.; WELCH, G. Nitric oxide and its role in the cardiovascular system. **Prog Cardiovasc Dis**, v. 38, p. 87-104. 1995.

LOUKILI, N.; ROSENBLATT-VELIN, N.; ROLLI, J.; LEVRAND, S.; FEIHL, F.; WAEBER, B.; PACHER, P.; LIAUDET, L. Oxidants positively or negatively regulate nuclear factor kB in a context-dependent manner. **J Biol Chem**, v. 285, p. 15746-15752. 2010.

LU, N. Z.; CIDLOWSKI, J. A. The origin and functions of multiple human glucocorticoid receptor isoforms. **Ann NY Acad Sci**, v. 1024, p. 102-123. 2004.

LUO, J.; KAMATA, H.; KARIN, M. IKK/NF-κB signaling: balancing life and death — a new approach to cancer therapy. **J Clin Invest**, v. 115, p. 2625-2632. 2005.

MANKAN, ARUN K.; LAWLESS, MATTHEW W.; GRAY, STEVEN G.; KELLEHER, DERMOT; MCMANUS, ROSS. NF-kB regulation: the nuclear response. **J Cell Mol Med**, v. 13, p. 631-643. 2009.

MARCZIN, N.; JILLING, T.; PAPAPETROPOULOS, A.; GO, C.; CATRAVAS, J. D. Cytoskeleton-dependent activation of the inducible

nitric oxide synthase in cultured aortic smooth muscle cells. **Br J Pharmacol**, v. 118, p. 1085-1094. 1996.

MARSHALL, H. E.; MERCHANT, K.; STAMLER, J. S. Nitrosation and oxidation in regulation of gene expression. **FASEB J**, v. 14, p. 1889-1900. 2000.

MARWICK, J. A.; CARAMORI, G.; STEVENSON, C. S.; CASOLARI, P.; JAZRAWI, E.; BARNES, P. J.; ITO, K.; ADCOCK, I. M.; KIRKHAM, P. A.; PAPI, A. Inhibition of PI3Kdelta restores glucocorticoid function in smoking-induced airway inflammation in mice. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 179, p. 542-548. 2009.

MATTHEWS, J.; BOTTING, C. H.; PANICO, M.; MORRIS, H. R.; HAY, R. T. Inhibition of NF-kB DNA binding by nitric oxide. **Nucleic Acids Res**, v. 24, p. 2236-2242. 1996.

MOLIJN, G. J.; KOPER, J. W.; VAN UFFELEN, C. J.; DE JONG, H.; BRINKMANN, A. O.; LAMBERTS, S. W. Temperature-induced down-induced of the glucocorticoid receptor in the peripheral blood mononuclear leukocyte in patients with sepsis or septic shock. **Clin Endocrinol**, v. 43, p. 197-203. 1995.

MONCADA, S.; HIGGS, E. A. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. **Br J Pharmacol**, v. 147, p. S193-S201. 2006.

MORGAN, M. J.; LIU, Z. Crosstalk of reactive oxygen species and NF-kB signaling. **Cell Res**, v. 21, p. 103-115. 2011.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 65, p. 55-63. 1983.

NATOLI, G.; CHIOCCA, S. Nuclear ubiquitin ligases NF-kB degradation, and the control of inflammation. **Sc Signal**, v. 1, p. DOI: 10.1126/stke.11pe1. 2008.

NISSEN, R.; YAMAMOTO, K. R. The glucocorticoid receptor inhibits NFkB by interfering with serine-2 phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. **Genes Dev**, v. 14, p. 2314-2329. 2000.

OWENS, G. K. Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. **Physiol Rev**, v. 75, p. 487-517. 1995.

PACHER, P.; BECKMAN, J. S.; LIAUDET, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. **Physiol Rev**, v. 87, p. 315-424. 2007.

PALMER, R. M. J.; ASHTON, D. S.; MONCADA, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. **Nature**, v. 333, p. 664-666. 1988.

PARK, H. S.; CHUN, J. N.; JUNG, H. Y.; CHOI, C.; BAE, Y. S. Role of NADPH oxidase 4 in lipopolysaccharide-induced proinflammatory responses by human aortic endothelial cells. **Cardiovasc Res**, v. 72, p. 447-455. 2006.

PARK, H.S.; JUNG, H.Y.; PARK, E.Y.; KIM, J.; LEE, W.J.; BAE, Y.S. Cutting edge: direct interaction of TLR4 with NAD(P)H oxidase 4 isozyme is essential for lipopolysaccharide-induced production of reactive oxygen species and activation of NF-kappa B. **J Immunol**, v. 173, p. 3589-3593. 2004.

PARK, M. D.; HUQ, X.; HU, L.; WEI, N. Tyrosine nitration on p65: a novel mechanism to rapidly inactivate nuclear factor-kappaB. **Mol Cell Proteomics**, v. 4, p. 300-309. 2005.

PATTERSON, C. E.; LUM, H. Update on pulmonary edema: the role and regulation endothelial barrier function. **Endothelium**, v. 8, p. 75-115. 2001.

PAWATE, S.; SHEN, Q.; FAN, F.; BHAT, N. R.. Redox regulation of glial inflammatory response to lipopolysaccharide and interferongamma. **J Neurosci Res**, v. 77, p. 540-551. 2004.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. **Rang & Dale Farmacologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 202-225. 2008.

ROTHWARF, D. M.; KARIN, M. The NF-kB Activation Pathway: A Paradigm in Information Transfer from Membrane to Nucleus. **Sci STKE**, v. 5, p. 1-16. 1999.

RUDIGER, A.; SINGER, M. Mechanisms of sepsis-induced cardiac dysfunction. **Crit Care Med**, v. 35, p. 1599-608. 2007.

RYAN, K. A.; SMITH, M. F. JR; SANDERS, M. K.; ERNST, P. B. Reactive oxygen and nitrogen species differentially regulate Toll-like receptor 4-mediated activation of NF-kappa B and interleukin-8 expression. **Infect Immun**, v. 72, p. 2123-2130. 2004.

SCHRECK, R.; RIEBER, P.; BAUERLE, P. A. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. **EMBO J**, v. 10, p. 2247-2258. 1991.

SEMENZA, G. L. New insights into nNOS regulation of vascular homeostasis. **J Clin Invest**, v. 115, p. 2976-2978. 2005.

SEN, R.; BALTIMORE, D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. **Cell**, v. 46, p. 705-716. 1986.

SHIH, V. F.; TSUI, R.; CALDWELL, A.; HOFFMANN, A. A single NFkB system for both canonical and non-canonical signaling. **Cell Res**, v. 21, p. 86-102. 2011.

SHIN, W.; HONG, Y. H.; PENG, H. B.; DE CATERINA, R.; LIBBY, P.; LIAO, J. K. Nitric oxide attenuates vascular smooth muscle cell activation by interferon-gamma. The role of constitutive NF-kappa B activity. **J Biol Chem**, v. 271, p. 11317-11324. 1996.

SIEGELMAN, M. H.; STANESCU, L. E.; ESTESS, P. The CD-44 initiates pathway of T-cell extravasation uses VLA-4 but not LFA-1 for firm adhesion. **J Clin Invest**, v. 105, p. 683-691. 2000.

SIMONCINI, T.; GENAZZANI, A. R.; LIAO, J. K. Nongenomic mechanisms of endothelial nitric oxide synthase activation by the selective estrogen receptor modulator raloxifene. **Circulation**, v. 105, p. 1368-1373. 2002.

SMITH, C. W. Endothelial adhesion molecules and their role in inflammation. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 71, p. 76-87. 1993.

SMOAK, K. A.; CIDLOWSKI, J. A. Mechanisms of glucocorticoid receptor signaling during inflammation. **Mech Ageing Dev**, v. 125, p. 697-706. 2004.

SORRELLS, S. F.; CASO, J. R.; MUNHOZ, C. D.; SAPOLSKY, R. M.;. The Stressed CNS: When Glucocorticoids Aggravate Inflammation. **Neuron**, v. 64, p. 33-39. 2009.

SRISKANTHARAJAH, S.; LEY, S. C. Turning off inflammation signaling. **Cell Biol**, v. 327, p. 1093-1095. 2010.

STAMLER, J. Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. **Cell**, v. 78, p. 931-936. 1994.

SUN, J.; STEENBERGEN, C.; MURPHY, E. S-nitrosylation: NO-related redox signaling to protect against oxidative stress. **Antioxid Redox Signal**, v. 8, p. 1693-1705. 2006.

SZABÓ, C.; ISCHIROPOULOS, H.; RADI, R. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. **Nat Rev Drug Discovery**, v. 6, p. 662-680. 2007.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern recognition receptors and inflammation. **Cell**, v. 140, p. 805-820. 2010.

TOGASHI, H.; SASAKI, M.; FROHMAN, E.; TAIRA, E. Neuronal (type I) nitric oxide synthase regulates nuclear factor kB activity and immunologic (type II) nitric oxide synthase expression. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 94, p. 2676-2680. 1997.

TORRES-DUEÑAS, D.; CELES, M. R.; FREITAS, A.; ALVES-FILHO, J. C.; SPILLER, F.; DAL-SECCO, D.; DALTO, V. F.; ROSSI, M. A.; FERREIRA, S. H; CUNHA, F.Q. Peroxynitrite mediates the failure of neutrophil migration in severe polymicrobial sepsis in mice. **Br J Pharmacol**, v. 152, p. 341-352. 2007.

TORTORA, G. J. **Corpo humano: fundamentos de anatomia e fisiologia**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, p. 166-167. 2003.

UMEZAWA, K.; ARIGA, A.; MATSUMOTO, N. Naturally occurring and synthetic inhibitors of NF-kB functions. **Anti-Cancer Drug Design**, v. 15, p. 239-244. 2000.

VAN BOXEL-DEZAIRE, A. H. H.; STARK, G. R. Cell type-specific signaling in responses to interferon-gamma. **CTMI**, v. 316, p. 119-154. 2007.

VAN DER LAAN, S.; MEIJER, O. C. Pharmacology of glucocorticoids: beyond receptors. **European J Pharmacol**, v. 585, p. 483-491. 2008.

VENKATARAMAN, S.; MUNOZ, R.; CANDIDO, C.; WITCHEL, S. F. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis in critical illness. **Rev Endocr Metab Disord**, v. 8, p. 365-373. 2007.

WILCKENS, T. Glucocorticoids and immune function: physiological relevance and pathogenic potential of hormonal dysfunction. **TIPS**, v. 16, p. 193-197. 1995.

WORTH, NATHALIE F.; ROLFE, BARBARA E.; SONG, JIAN. Vascular smooth muscle cell phenotypic modulation in culture is associated with reorganisation of contractile and cytoskeletal proteins. **Cell Motil Cytoskeleton**, v. 49, p. 130-142. 2001.

YAKOVLEV, V. A.; BARANI, I. J.; RABENDER, C. S.; BLACK, S. M.; LEACH, J. K.; GRAVES, P. R.; KELLOGG, G. E.; MIKKELSEN, R. B. Tyrosine nitration of IkappaBalpha: a novel mechanism for NF-kappaB activation. **Biochem**, v. 46, p. 11671-11683. 2007.

ZHOU, J.; CIDLOWSKI, J. A. The human glucocorticoid receptor: One gene, multiple proteins and diverse responses. **Steroids**, v. 70, p. 407-417. 2005.